

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Maria Alice Santos Pereira

Estudos Estruturais e Enzimáticos de Proteínas
Envolvidas no Metabolismo do Enxofre

Caracterização de Enzimas Isoladas
de
Desulfovibrio sp. e *Thiobacillus sp.*



Lisboa, 1994

Maria Alice Santos Pereira

Estudos Estruturais e Enzimáticos de Proteínas
Envolvidas no Metabolismo do Enxofre

Caracterização de Enzimas Isoladas
de
Desulfovibrio sp. e *Thiobacillus sp.*

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Doutor em
Química, especialidade Química
Inorgânica, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de
Ciências e Tecnologia.

Lisboa, 1994



- N° de arquivo:

- "Copyright":

Ao Pedro,

Aos meus pais,

Aos meus irmãos.

Agradecimentos

O trabalho aqui apresentado foi realizado no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) da Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação dos Professores José Moura e Jorge Lampreia. Quero expressar o meu agradecimento a eles e a todos aqueles que, consciente ou inconscientemente, me apoiaram e inspiraram. Sem o seu auxílio, os seus conselhos e o seu apoio, nunca poderia ter realizado este trabalho.

Ao Professor José Moura quero agradecer a possibilidade que me deu e a porta que me abriu neste campo tão estimulante, que são as proteínas de ferro-enzofre. A sua contribuição foi essencial, quer no planeamento, quer na interpretação de todos os resultados. A sua capacidade, competência e conhecimento são notáveis, o que se reflecte directamente no grupo que orienta.

Ao Professor Jorge Lampreia, co-orientador desta Tese, agradeço toda a contribuição que, directa ou indirectamente, me deu. Admiro a sua visão global de tudo o que o rodeia, bem como o seu enorme conhecimento que tem das coisas da vida.

À Professora Isabel Moura, quero agradecer o estar sempre ali ao lado, disponível para as eventuais discussões científicas. A sua capacidade e ritmo de trabalho são impressionantes.

Ao Professor Boi Hanh Huynh, da Universidade de Emory em Atlanta, agradeço, antes de mais a sua simpatia e a amizade com que sempre me recebeu no seu laboratório. A sua colaboração na aquisição e interpretação dos espectros de Mössbauer e de alguns espectros de RPE, foi muito importante neste trabalho. Aprecio a sua capacidade pedagógica, o rigor e seriedade com que executa, constantemente, o seu trabalho.

Ao Professor Jean LeGall (Departamento de Bioquímica da Universidade da Georgia, Athens, USA) agradeço o ter facultado os muitos extractos celulares da maioria das bactérias de onde foi purificada a redutase do APS.

Ao Pedro Tavares, Anjos Macedo, Ricardo Franco, Jorge Caldeira e Nuno Palma agradeço todo o contributo que deram para o melhoramento do laboratório, em geral, facilitando assim, a execução do meu trabalho. À Anjos Macedo quero ainda agradecer a sua simplicidade no tratamento com as pessoas. Ao Ricardo Franco, agradeço a sua inteira disponibilidade e amizade. Tem sido um bom companheiro de trabalho nos inúmeros estudos de RPE. Agradeço-lhe também a sua contribuição no estudo das proteínas isoladas de *D. desulfuricans* NJ, em particular da higrógenase, descrito no capítulo VII.

À Professora Ana Rosa Lino, agradeço o apoio que sempre me deu. A ela agradeço o ter disponibilizado os meios para o crescimento da bactéria *D. desulfuricans* NJ.

Ao Doutor Juan Calvette (CSIC-Instituto Rocasolano de Madrid), a contribuição que me deu na obtenção da sequência N-terminal do citocromo c_3 de *D. desulfuricans* NJ. Agradeço-lhe, também, o muito que me ensinou sobre a técnica de electroforese e sequenciação de proteínas.

Ao Doutor Natarajan Ravi, a sua contribuição nos estudos de Mössbauer.

Ao Professor Van Beeumen e seus colaboradores (Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent, Bélgica) agradeço a contribuição na determinação da sequência N-terminal da nova proteína de *Dsm. baculatus*.

Aos meus colegas, Carla Carneiro, Catarina Gião, Doutora Cristina Costa, Cristina Moreno, Marta Carepo, Mauro Scharf, Pedro Rodrigues, Rui Duarte, Susana Prazeres e Professor Belarmino Barata, quero agradecer a sua presença e convívio constante no laboratório. À Susana, agradeço-lhe ainda a ajuda que me deu na obtenção dos espectros de RMN do citocromo c_3 de *D. desulfuricans* NJ.

Aos meus colegas mais novos, Maria José Feio, Miguel Prudêncio, Luís Veloso e Cristina Peixoto, agradeço o seu dinamismo e o alegre convívio durante este último ano. À Maria José tenho que agradecer, também, o seu empenho e contributo no estudo da desulforubidina de *D. desulfuricans* NJ.

Ao Professor António Xavier, director do ITQB, por ter apoiado a minha candidatura à bolsa de Doutoramento e ter disponibilizado as infra-estruturas existentes no instituto.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) o ter-me concedido a bolsa de Doutoramento, que possibilitou a realização desta Tese.

As últimas linhas, reservo-as a pessoas muito especiais. À minha mãe, ao meu pai, à minha irmã Fernanda e ao meu irmão Zé, quero agradecer tudo o que sou e represento. Deles nunca esquecerei a sua constante presença, a alegria e a ajuda imprescindível que sempre me deram e que foram essenciais à realização desta Tese.

Por último, mas mais importante, um agradecimento singelo mas muito sincero ao Pedro, a quem tantas vezes me esqueço de agradecer. Sem ele este trabalho não teria sido possível. Para ele, contribuíu com a sua paciência, dedicação e ajuda.

Resumo

Ao longo da última década foi evidenciado o papel dos centros ferro-enxofre como constituinte do sítio activo de várias enzimas envolvidas em reacções de transferência electrónica, oxidação-redução de substratos, transferência de grupos não-redox e regulação da actividade enzimática. As proteínas de ferro-enxofre participam, assim, em processos biológicos muito importantes para o bom funcionamento da célula, tais como o ciclo de Krebs, a fotossíntese, a cadeia respiratória ou a síntese e reparação de DNA.

Os agregados do tipo [4Fe-4S] são, na realidade, os centros ferro-enxofre que predominam na natureza. Para além do seu importante papel no transporte electrónico, podem desempenhar funções catalíticas. Exemplos de proteínas que possuem este tipo de agregado são a hidrogenase, a redutase do sulfito, a redutase do APS ou as hidratases/desidratases do tipo da aconitase. A catálise envolve a interacção directa do substrato com o agregado [4Fe-4S] originando alterações estruturais nestes.

Nesta dissertação, descreve-se o estudo de proteínas de ferro-enxofre isoladas de bactérias envolvidas no metabolismo do enxofre, em particular a redutase do APS e a redutase do sulfito.

A redutase do APS é uma das principais enzimas que intervêm na redução dissimilativa do sulfato. Esta enzima catalisa a reacção reversível de conversão do APS (a forma activada do sulfato) a sulfito e AMP. Presente em todas as bactérias redutoras de sulfato, nomeadamente do género *Desulfovibrio*, foi também isolada de uma arqueobactéria *Archaeoglobus fulgidus* e de algumas bactérias do género *Thiobacillus*.

Neste trabalho, apresenta-se a purificação e caracterização da redutase do APS de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, de *Thiobacillus denitrificans* ATCC 23642 e de uma bactéria redutora de sulfato isolada do interior de tubagens de ferro sob corrosão activa, *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* New Jersey.

Verificou-se que, de um modo geral, as redutases do APS são proteínas muito homólogas, em termos da massa molecular, composição do sítio activo e propriedades

espectroscópicas dos seus cromóforos. A redutase do APS é uma proteína de elevada massa molecular (160–180 kDa) que contém dois agregados [4Fe-4S] (denominados centro I e centro II) e uma unidade FAD. O espectro de UV/visível da proteína na forma nativa é caracterizado por uma banda larga com absorção máxima a ~ 388 nm e dois ombros entre 475 e 445 nm, geralmente observados em flavoproteínas que contêm agregados ferro-enxofre.

O espectro de RPE da amostra nativa apresenta um sinal quase isotrópico a $g \sim 2.02$, que representa entre 0.1 e 0.2 spins/molécula. A forma do sinal, bem como as suas propriedades de saturação com a temperatura e a potência aplicada, indicam que esta espécie provém de um agregado do tipo $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$. A adição dos substratos naturais (sulfito e AMP) produz uma perturbação, quer na flavina, quer no centro I. A incubação da enzima nativa com sulfito induz a formação de um aducto entre o substrato e o grupo FAD, o que pode ser detectado no espectro de UV/visível pelo aumento da absorção na região dos 320 nm. A posterior adição de AMP origina o aparecimento de um sinal rômbico atribuído ao centro I no espectro de RPE ($g = 2.096, 1.94$ e 1.89), com valores de g e larguras de linha ligeiramente diferentes do sinal obtido por redução química. A redução rápida com ditionito de sódio ($t < 1$ minuto, a $\text{pH} \geq 9.0$) origina o desenvolvimento total do centro I, que é caracterizado por um conjunto de ressonâncias com valores de g iguais a 2.08, 1.94 e 1.90. Este sinal possui uma área correspondente a ~ 1 spin/molécula e é detectável até cerca de 35 K. Dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer revelam que neste estado a proteína se encontra 50% reduzida. A incubação da enzima com mais ditionito, durante cerca de 30 minutos, provoca o aparecimento de um sinal de RPE típico de agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ em interação magnética. Este resultado, em combinação com a quantificação de ferro, apoia a presença de dois agregados ferro-enxofre do tipo [4Fe-4S] na redutase do APS das bactérias em estudo, tal como observado por Lampreia e colaboradores para a redutase de *D. gigas*. O centro I apresenta parâmetros de Mössbauer pouco habituais ($\Delta E_Q = 2.06$ mm/s e $\delta = 0.61$ mm/s) e um potencial de oxidação-redução de ~ 0 mV, invulgarmente elevado para este tipo de agregado. O centro II na forma reduzida apresenta

propriedades espectroscópicas e valor de potencial semelhantes aos agregados presentes nas ferredoxinas bacterianas.

A interacção do *p*HMB com a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi também estudada. Verificou-se que este reagente mercurial promove a conversão dos agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ na forma $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$. Paralelamente, observou-se que esta conversão é acompanhada por uma perda de mais de 50% da actividade total da enzima.

Foi ainda estudada a interacção de NO e CN^- com a enzima. A incubação desta com NO origina o aparecimento de um sinal axial no espectro de RPE, com $g_{\parallel}=2.039$ e $g_{\perp}=2.016$. Para a identificação desta espécie prepararam-se amostras de ferredoxina I e II (*D. gigas*) incubadas com NO e sintetizou-se um composto modelo de Fe(II), cisteína e nitrito de sódio/ditionito. Em todas as amostras foi detectada a espécie "g=2.04". No entanto, quando se adiciona uma baixa concentração de NO à ferredoxina II, observa-se uma espécie rômica ($g=2.04, 2.01$ e 1.97) que pode ser convertida na espécie axial por adição de mais NO. A simulação do espectro de RPE do composto modelo adquirido à temperatura ambiente revelou que a espécie paramagnética induzida pelo NO era do tipo $[\text{Fe}(\text{Cis})_2(\text{NO})_2]$.

A incubação da redutase do APS parcialmente reduzida com cianeto causa a conversão total do centro I numa espécie rômica com valores de $g=2.12, 2.04$ e 1.99 . O sinal representa 1 spin/molécula e é detectado a mais de 70 K.

Finalmente, foi purificada e caracterizada uma proteína nova da bactéria *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974 que, por comparação com as propriedades físico-químicas da redutase do sulfito de *E. coli*, se pensa ser do tipo assimilativo. A proteína, denominada proteína P₅₇₂, apresenta uma massa molecular de 150 kDa, e uma única cadeia polipeptídica de 45.5 kDa. Contém 10 átomos de ferro, dois dos quais estão inseridos em grupos sirohemo, e 4 unidades flavinas. O espectro de UV/visível é caracterizado por picos de absorção máxima a 572, 390 e 280 nm. A redução química da proteína origina um decréscimo global da absorção e um aparecimento de um pico a 593 nm. A sequência de ácidos aminados da região N-terminal apresenta quase 100% de homologia com a da proteína de *Dsm. desulfuricans* Norway 4.

Abstract

The past decade disclosed the role of iron-sulfur centers as a constituent of the active site of several different enzymes involved in electron transfer, oxidation/reduction of substrates, non-redox group transfer, oxygen insertion and regulation of enzymatic activities. Iron-sulfur enzymes participate in important biologic functions, such as the Krebs cycle, photosynthesis, the respiratory chain or the DNA synthesis and repair.

The [4Fe-4S] clusters are the most common iron-sulfur clusters present in nature. Besides the important role played in electron transfer, these clusters can have catalytic functions. Hydrogenase, sulfite reductase, APS reductase or aconitase like hydratases/dehydratases are examples of such enzymes.

This dissertation describes the study of iron-sulfur proteins isolated from bacteria involved in the sulfur metabolism, such as APS reductase and sulfite reductase.

APS reductase is one of the key enzymes involved in the dissimilatory sulfate reduction. This enzyme catalysis the reversible conversion of APS (the activated sulfate form) into sulfite and AMP. It is present in all sulfate reducing bacteria (SRB), as well as in *Archaeoglobus fulgidus* and in some bacteria of the *Thiobacillus* genus. In this work it is presented the purification and characterization of APS reductases from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Thiobacillus denitrificans* ATCC 27774 and from a new SRB, isolated from biocorroded heater exchangers, named *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* New Jersey. It is showed that, in general, all these reductases are homologous in terms of molecular mass, active site composition and spectroscopic properties of the chromophores. APS reductase is a protein of high molecular mass (160-180 kDa) that contains two [4Fe-4S] clusters (named center I and center II) and one FAD molecule. The characteristic UV/Visible spectrum shows a maxima around 380 nm and two shoulders at 475 and 445 nm, typical of flavoproteins that contain iron-sulfur clusters. The electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum of the native sample, shows an almost isotropic signal at $g \sim 2.02$, that quantifies to 0.1-0.2 spins/molecule. The signal

shape, along with the microwave power and temperature saturation behaviour, points to the fact that this signal is due to a [3Fe-4S] cluster. The addition of the natural substrates (AMP and sulfite) induces changes in both the flavin group and center I. Incubation of the native enzyme with sulfite induces the formation of an adduct between substrate and the FAD group, that can be detected in the UV/visible spectrum due to a raise in absorbance around 320 nm. The subsequent addition of AMP to a sample reacted with sulfite results in the appearance of a rhombic signal in the EPR spectrum attributed to center I, that possesses g values ($g=2.096, 1.94$ and 1.89) and line widths distinct from those obtained upon chemical reduction. A short time reduction with sodium dithionite ($t < 1$ minute, at $\text{pH} \geq 9.0$) gives rise to the fully developed center I EPR signal. This signal is characterized by a set of resonances with g values equal to 2.08, 1.94 and 1.90, corresponding to approximately 1 spin/molecule and detectable until 35 K. Mössbauer spectroscopic data unveil that in this redox state the protein is in the half reduced state. Further incubation with sodium dithionite during ~ 30 minutes produces the appearance of a complex EPR signal typical of magnetic interacting $[4\text{Fe-4S}]^{+1}$ clusters. These results, in association with the iron quantitation data, support the presence of two [4Fe-4S] clusters in APS reductase as suggested by Lampreia *et al.* Center I presents both unusual Mössbauer parameters ($\Delta E_Q = 2.06$ mm/s and $\delta = 0.61$ mm/s) and high redox potential value (approximately 0 mV). Center II presents spectroscopic and redox properties similar to the ones found on bacterial ferredoxins.

The interaction of pHMB with APS reductase isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 was also studied. It was showed that this mercurial reagent promotes the conversion of $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ clusters into $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ form. Simultaneously it was observed a close to 50% decrease in activity. Moreover, it was studied the interaction of NO and CN^- with the enzyme. Incubation with NO gives rise to an axial EPR signal with g values equal to 2.039 and 2.016. In order to identify this specie samples of *Desulfovibrio gigas* ferredoxin I and II were incubated with NO, and a Fe(II), cystein and sodium nitrite/dithionite model compound was prepared. In all these samples the " $g=2.04$ " specie was detected. In ferredoxin II samples, when a low concentration of NO was used, a

rhombic EPR specie ($g=2.04$, 2.01 and 1.97) was also seen. This specie could be converted into an axial specie by further addition of NO. The simulation of the EPR spectrum obtained at room temperature for the model compound revealed that the paramagnetic specie induced by NO was of the $[\text{Fe}(\text{Cys})_2(\text{NO})_2]$ type.

Incubation of partially reduced APS reductase with cyanide causes the total conversion of center I into a rhombic specie with g values equal to 2.12 , 2.04 and 1.99 . This signal still detected above 70 K and quantifies to 1 spin/molecule .

Finally, a new protein from *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974 was purified. By comparison with a sulfite reductase isolated from *E. coli* this protein is thought to be an assimilatory sulfite reductase. This protein presents a molecular mass equal to 150 kDa , and a single polypeptide chain of 45.5 kDa . It contains 10 iron atoms, with two of them being part of an equal number of sirohemes, and 4 flavins. The UV/visible spectrum is characterized by maxima at 572 , 390 and 280 nm . After chemical reduction a bleach in absorbance and a new peak at 593 nm can be observed. The N-terminal amino acid sequence shows almost 100% homology with the assimilatory sulfite reductase isolated from *Dsm. desulfuricans* Norway 4.

Abreviaturas

A.	<i>Archaeoglobus</i>
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
APS	Fosfo-sulfato de adenosina (sulfato de adenilil)
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATP	Trifosfato de adenosina
Az.	<i>Azotobacter</i>
B.	<i>Bacillus</i>
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
C.	<i>Clostridium</i>
δ	Desvio isomérico
D.	<i>Desulfovibrio</i>
D.d.	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
Da	Dalton
DEAE	Dietil-amino-etil-celulose
ΔE_Q	Desdobramento de quadrupolo
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Drm.	<i>Desulfuromonas</i>
Dsm.	<i>Desulfomicrobium</i>
Dtm.	<i>Desulfotomaculum</i>
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
FAD	Flavina adenina di-nucleotídeo
Fd	Ferredoxina
Fe-S	Centro de ferro-enxofre
FMN	Flavina mono-nucleotídeo

HiPIP	Proteína de ferro de potencial elevado
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HTP	Hidroxilapatite
IRE	Elemento regulador do ferro
IRE-BP	Proteína de ligação ao elemento regulador do ferro
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato
PAPS	Sulfato 3'-fosfoadenilil
Pi	Fosfato inorgânico
PPi	Pirofosfato inorgânico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RPE	Ressonância Paramagnética Electrónica
S	Spin electrónico
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
<i>T.</i>	<i>Thiobacillus</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano

Índice Geral

I. A relevância do enxofre nos sistemas biológicos. A redução da molécula de sulfato.	
1. Introdução	3
2. O ciclo do enxofre	4
3. A oxidação dos compostos de enxofre	6
3.1. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias fototróficas	6
3.2. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias quimiolitotróficas	8
4. A redução dos compostos de enxofre	9
4.1. A redução da molécula de sulfato	11
4.1.1. A redução assimilativa do sulfato	11
4.1.1.1. A via metabólica do PAPS	12
4.1.1.2. A via metabólica do APS	12
4.1.2. A redução dissimilativa do sulfato	13
4.2. A redução de enxofre elementar	17
4.2.1. As eubactérias redutoras de enxofre	18
4.2.2. As arqueobactérias redutoras de enxofre	18
5. As enzimas e as proteínas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato	19
5.1. A sulfúrilase do ATP e a pirofosfatase inorgânica	19
5.2. A redutase do APS	21
5.3. As redutases do sulfito	21
5.4. Os citocromos	23
5.5. As hidrogenases	25
5.6. Proteínas de transporte electrónico	27
6. As bactérias redutoras de sulfato	28
6.1. Posição taxonómica das BRS	29
6.2. O impacto ambiental e económico das BRS	31

7. Bibliografia	33
II. A importância dos centros ferro enxofre em sistemas biológicos.	41
1. Introdução	43
2. A estequiometria dos centros ferro-enxofre	45
2.1. O centro FeCis ₄	45
2.2. O agregado [2Fe-2S]	47
2.3. O agregado [4Fe-4S]	48
2.4. O agregado [3Fe-4S]	49
2.5. Interconversão entre os agregados [3Fe-4S] e [4Fe-4S]	50
2.6. Agregados com outras estequiometrias	51
3. Propriedades magnéticas e de oxidação-redução dos centros ferro-enxofre	55
3.1. O centro FeCis ₄	56
3.2. O agregado [2Fe-2S]	57
3.3. O agregado [4Fe-4S]	58
3.4. O agregado [3Fe-4S]	60
4. O papel não-redox dos agregados [4Fe-4S]	62
4.1. O bifuncionalismo da aconitase	62
4.1.1. O papel enzimático da aconitase	62
4.1.2. O papel regulatório da aconitase	70
4.2. A endonuclease III	73
4.3. A amidotransferase da glutamina 5-fosforibosil-1-pirofosfato	76
4.4. Outras proteínas que contêm agregados [4Fe-4S] com função não-redox	77
5. Alguns aspectos evolutivos dos centros ferro-enxofre	78
6. Bibliografia	87
III. As redutases do APS anteriormente descritas.	97
1. Introdução	99
2. As redutases do APS das bactérias redutoras de sulfato	102

3. As redutases do APS das bactérias do género <i>Thiobacillus</i>	106
4. As redutases do APS de bactérias fototróficas de enxofre	108
5. A redutase do APS da arqueobactéria <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	109
6. A formação de aducto entre a flavina da redutase do APS e o sulfito	110
7. O mecanismo da redutase do APS	111
8. Bibliografia	120
IV. Caracterização espectroscópica da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	123
1. Introdução	126
2. Purificação da redutase do APS	126
3. Caracterização bioquímica da redutase do APS	128
3.1. Determinação da massa molecular	128
3.2. Composição das subunidades	128
3.3. Composição em ácidos aminados	131
3.4. Sequência de ácidos amidos da região N-terminal das subunidades	132
3.5. Conteúdo em ferro	133
3.6. Conteúdo em flavina	134
4. Estudos cinéticos	134
4.1. Determinação dos parâmetros cinéticos	134
4.1.1. Ferricianeto como aceitador de electrões	136
4.1.2. Citocromo <i>c</i> como aceitador de electrões	136
4.2. Determinação do pH _{óptimo}	139
4.3. Estabilidade da enzima. Reactivação da redutase do APS	142
5. Caracterização espectroscópica da redutase do APS	144
5.1. Espectroscopia de UV/visível	144
5.2. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de visível	145
5.2.1. Adição de sulfito e AMP à redutase do APS	145
5.2.2. Adição de ditonito de sódio à redutase do APS	148

5.3. Espectroscopia de RPE	148
5.4. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de RPE	149
5.4.1. Adição de AMP e sulfito	149
5.4.2. Redução parcial da redutase do APS	151
5.4.3. Redução total da redutase do APS	152
5.5. Espectroscopia de Mössbauer	155
6. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS	160
6.1. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de UV/visível	160
6.2. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de RPE	163
7. O efeito do pHMB na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i>	166
7.1. Titulação das cisteínas com pHMB	168
7.2. O efeito do pHMB na actividade da redutase do APS	170
7.3. Efeito do pHMB no espectro de UV/visível da redutase do APS	172
7.4. Efeito do pHMB no espectro de RPE da redutase do APS	176
8. Discussão	181
9. Bibliografia	186
V. A interacção de pequenas moléculas com a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	189
1. Introdução	191
2. A interacção do NO com a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	194
2.1. Adição de NO à enzima parcialmente reduzida	194
2.2. Adição de NO à enzima totalmente reduzida	198
2.3. Adição de NO à enzima reagida com sulfito e AMP	200
3. Interacção do NO com a ferredoxina I e a ferredoxina II de <i>D. gigas</i>	202

4. Estudo de um composto modelo para a interacção do NO com proteínas de ferro-enxofre	205
4.1. Espectros de RPE à temperatura ambiente	206
4.2. Espectros de RPE a baixa temperatura	208
5. Discussão	213
6. A interacção do cianeto com a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	215
6.1. O efeito do cianeto no espectro de visível	215
6.2. O efeito do cianeto no espectro de RPE	217
7. Discussão	221
8. Bibliografia	223
VI. Purificação e caracterização da redutase do APS de <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 23642.	225
1. Introdução	227
2. Crescimento bacteriano e purificação	228
3. Caracterização bioquímica	229
3.1. Determinação da massa molecular e composição das subunidades	229
3.2. Determinação do conteúdo em ferro	229
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	230
4. Caracterização espectroscópica	233
4.1. Espectroscopia de UV/visível	233
4.2. Espectroscopia de RPE	238
5. Discussão	240
6. Bibliografia	242
VII. Identificação, purificação e caracterização preliminar de proteínas de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	243
1. Introdução	245
2. Crescimento bacteriano e preparação do extracto celular	246

3. Identificação e purificação da redutase do APS	248
3.1 Purificação da redutase do APS	249
3.2. Purificação de proteínas úteis para a classificação taxonómica da espécie em estudo	249
3.2.1. Desulforubidina	249
3.2.2. Citocromo c_3 (periplasmático)	252
3.2.3. Hidrogenase membranar	252
4. Caracterização das proteínas purificadas de <i>D. desulfuricans</i> NJ	253
4.1. Caracterização da redutase do APS	253
4.2. Caracterização da desulforubidina	258
4.3. Caracterização do citocromo c_3 periplasmático	261
5. Discussão	266
6. Bibliografia	270
VIII. Purificação e caracterização de uma nova proteína de <i>Desulfomicrobium baculatus</i> DSM 9974	273
1. Introdução	275
2. Crescimento bacteriano e purificação da proteína P ₅₇₂	278
3. Determinação da massa molecular e composição das subunidades	279
4. Composição de ácidos aminados	283
5. Sequência de ácidos aminados da região NH ₂ -terminal	284
6. Determinação do conteúdo em ferro	285
7. Determinação do conteúdo em sirohemio	285
8. Determinação do conteúdo em flavina	286
9. Espectroscopia de UV/visível	287
10. Espectroscopia de RPE	289
11. Discussão	291
12. Bibliografia	296
Apêndice A. Métodos Analíticos.	299
1. Meios de crescimento e preparação do extracto celular	301

2. Determinação da proteína. Método de Lowry.	302
3. Determinação do conteúdo em ferro. Método do TPTZ.	303
4. Determinação do conteúdo em flavina	305
5. Electroforese em gel de poliacrilamida	306
5.1. Electroforese em condições desnaturantes	306
5.2. Electroforese em condições não desnaturantes	311
5.3. Transferência electroforética para membranas de PVDF	311
6. Hidrólise ácida e oxidação perfórmica	318
7. Ensaio de actividade da redutase do APS	320
7.1. Ferricianeto como aceitador de electrões	320
7.2. Citocromo c de cavalo como aceitador de electrões	321
8. Titulações potenciométricas	323
8.1. Titulações acopladas à espectroscopia de UV/visível	323
8.2. Titulações acopladas à espectroscopia de RPE	324
8.3. Análise das curvas de titulação	324
9. Espectrofotómetro de UV/visível	327
10. Espectrómetro de RPE	327
11. Espectrómetro de Mössbauer	327
12. Bibliografia	328

Índice de Figuras

Figura I.1. O ciclo do enxofre.	5
Figura I.2. Representação esquemática dos mecanismos hipotéticos de oxidação de compostos de enxofre em organismos do género <i>Thiobacillus</i> .	10
Figura I.3. A redução dissimilativa do sulfato.	14
Figura I.4. Localização celular das enzimas e proteínas de transporte electrónico na bactéria redutora de sulfato <i>D. vulgaris</i> .	20
Figura II.1. As estruturas básicas dos centros ferro enxofre.	46
Figura II.2. Interconversão e reconstituição dos agregados [4Fe-4S] e [3Fe-4S]. Marcação isotópica selectiva e formação de agregados heterometálicos.	52
Figura II.3. As estruturas propostas para o agregado P e o co-factor FeMoco da nitrogenase de <i>Az. vinelandii</i> , determinadas por cristalografia de Raios-X.	53
Figura II.4. Mecanismo reaccional proposto para a aconitase.	68
Figura II.5. Modelo de regulação da IRE-BP.	72
Figura III.1. A molécula de APS, que serve de substrato à redutase do APS.	100
Figura III.2. A estrutura do aducto entre a flavina e a molécula de sulfito.	111
Figura III.3. O mecanismo de catálise da redutase do APS proposto, em 1982, por Bramlett e colaboradores.	114
Figura III.4. O mecanismo catalítico da redutase do APS proposto por Lampreia e colaboradores, em 1989.	116
Figura IV.1. Esquema da purificação da redutase do APS da bactéria <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	129
Figura IV.2. Determinação da composição e massa molecular das subunidades da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> .	130

Figura IV.3. Sequência N-terminal da subunidade maior da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	132
Figura IV.4. Espectro da flavina da redutase do APS, após precipitação da proteína com TCA.	135
Figura IV.5. Determinação dos valores de K_m da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> através da linearização de Lineweaver-Burk, usando ferricianeto como aceitador de electrões.	137
Figura IV.6. Determinação dos K_m da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> , usando citocromo <i>c</i> de coração de cavalo como aceitador de electrões, através da linearização de Lineweaver-Burk.	138
Figura IV.7. Determinação do pH _{óptimo} da redutase do APS.	141
Figura IV.8. Reactivação da redutase do APS após inactivação por armazenamento.	143
Figura IV.9. Espectro de UV/visível da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	144
Figura IV.10. Efeito da adição dos substratos e de ditionito de sódio no espectro de visível da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> .	146
Figura IV.11. Espectros de diferença entre a redutase do APS nativa e reagida com os substratos.	147
Figura IV.12. Espectros de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> em diferentes estados de oxidação.	150
Figura IV.13. Espectros de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 parcialmente reduzida.	152
Figura IV.14. Dependência da temperatura do sinal de RPE da redutase do APS no estado totalmente reduzido.	154
Figura IV.15. Espectros de Mössbauer da redutase do APS isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774 adquiridos na presença de um campo magnético aplicado de 500 G.	156
Figura IV.16. Espectro de Mössbauer do centro I da redutase do APS isolada de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	158

Figura IV.17. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> , por titulação potenciométrica com ditionito de sódio seguida por UV/visível.	161
Figura IV.18. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> , por titulação potenciométrica com sulfito e ditionito de sódio, seguida por UV/visível.	164
Figura IV.19. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> , por titulação potenciométrica acoplada à espectroscopia de RPE.	166
Figura IV.20. Quantificação dos resíduos cisteicos presentes na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> com pHMB, segundo o método de Boyer.	169
Figura IV.21. Efeito do pHMB na actividade da redutase do APS na presença de ferricianeto de potássio como aceitador de electrões.	170
Figura IV.22. Efeito do pHMB na actividade da redutase do APS na presença de citocromo c de cavalo como aceitador de electrões.	171
Figura IV.23. Efeito do pHMB no espectro de visível da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> .	173
Figura IV.24. Efeito do pHMB (0.2 mM) ao longo do tempo, na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	174
Figura IV.25. Efeito dos substratos no espectro de visível da redutase do APS incubada com pHMB.	175
Figura IV.26. Efeito do pHMB (2x excesso) no espectro de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> .	177
Figura IV.27. Adição de sulfito, AMP e ditionito à amostra reoxidada após incubação com pHMB (2x excesso).	179

Figura IV.28. Efeito da adição de quantidades crescentes de <i>p</i> HMB no espectro de RPE da redutase do APS parcialmente reduzida com ditionito de sódio.	180
Figura IV.29. Modelo esquemático para a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	184
Figura V.1. O papel do NO nos sistemas biológicos.	193
Figura V.2. O efeito do NO no espectro de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> no estado semi reduzido.	195
Figura V.3. Dependência da temperatura e da potência do sinal induzido pelo NO na redutase do APS semi-reduzida.	196
Figura V.4. O efeito do NO na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> no estado totalmente reduzido.	199
Figura V.5. Efeito do NO na redutase do APS reagida com sulfito e AMP.	201
Figura V.6. Efeito do NO na ferredoxina I de <i>D. gigas</i> .	203
Figura V.7. Efeito do NO na ferredoxina II de <i>D. gigas</i> .	204
Figura V.8. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO, adquiridos à temperatura ambiente.	207
Figura V.9. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO, adquiridos à temperatura do azoto líquido.	209
Figura V.10. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO traçados a 45 K.	210
Figura V.11. Efeito da substituição isotópica com ⁵⁷ Fe, no composto modelo Fe(II)-Cis-NO.	211
Figura V.12. Variação da intensidade do sinal "g=2.04" do composto modelo em função da potência da micro-onda aplicada.	212
Figura V.13. Variação da intensidade do sinal "g=2.04" do composto modelo com a temperatura.	213
Figura V.14. Efeito do CN ⁻ no espectro de visível da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	216

Figura V.15. Variação da absorvância a 388 nm em função da concentração de cianeto.	217
Figura V.16. Efeito do CN^- no espectro de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> .	218
Figura V.17. Dependência da intensidade do sinal de RPE induzido pelo CN^- , na redutase do APS, com a temperatura.	219
Figura V.18. Dependência da potência do sinal de RPE induzido pelo CN^- , traçada a 35 K.	220
Figura VI.1. Determinação das subunidades da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> por electroforese em gel de poliacrilamida.	230
Figura VI.2. Determinação do valor de K_m para o sulfito da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> , através da linearização de Lineweaver-Burk.	231
Figura VI.3. Determinação do valor de K_m para o AMP da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> , através da linearização de Lineweaver-Burk.	232
Figura VI.4. Variação da actividade da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> em função do pH.	233
Figura VI.5. Espectro de UV/visível da redutase do APS isolada de <i>Thiobacillus denitrificans</i> .	234
Figura VI.6. Efeito da adição dos substratos no espectro de visível da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> .	236
Figura VI.7. Espectros diferença entre a redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> nativa e a enzima reagida com sulfito e AMP.	237
Figura VI.8. Espectros de RPE da redutase do APS de <i>T. denitrificans</i> em diferentes estados de oxidação do ciclo catalítico.	239
Figura VII.1. Representação esquemática da purificação das proteínas que predominam na espécie <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> NJ.	250
Figura VII.2. Espectro de UV/visível da redutase do APS purificada de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	254

Figura VII.3. Efeito da adição de substratos naturais no espectro de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	257
Figura VII.4. Espectro de UV/visível da desulforubidina de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	259
Figura VII.5. Espectro de RPE da desulforubidina de <i>D. desulfuricans</i> NJ, no estado oxidado.	261
Figura VII.6. A estrutura do grupo hémico do citocromo c_3 .	262
Figura VII.7. Comparação das sequências de ácidos aminados da região NH ₂ -terminal dos citocromos c_3 isolados de <i>D. desulfuricans</i> NJ e de <i>Dsm. desulfuricans</i> Norway 4.	263
Figura VII.8. Espectro de UV/visível do citocromo c_3 de <i>D. desulfuricans</i> NJ	264
Figura VII.9. Espectro de ¹ H-RMN do citocromo c_3 de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	265
Figura VII.10. Espectro de RPE do citocromo c_3 de <i>D. desulfuricans</i> NJ, no estado oxidado.	266
Figura VIII.1. Estrutura da unidade sirohemo.	277
Figura VIII.2. Esquema de purificação da proteína P ₅₇₂ de <i>Dsm. baculatus</i> 9974.	280
Figura VIII.3. Determinação da massa molecular da proteína P ₅₇₂ de <i>Dsm. baculatus</i> , por cromatografia de filtração em gel.	281
Figura VIII.4. Determinação das subunidades da proteína P ₅₇₂ por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.	282
Figura VIII.5. Comparação das sequências N-terminal da proteína P ₅₇₂ isolada de <i>Dsm. baculatus</i> DSM 9974 com a proteína homóloga de <i>Dsm. desulfuricans</i> Norway 4 e com a redutase do sulfito assimilativa de <i>D. vulgaris</i> .	284
Figura VIII.6. Espectro de visível do complexo sirohemo-piridina extraído com acetona/HCl da proteína P ₅₇₂ de <i>Dsm. baculatus</i> .	286

Figura VIII.7. Espectro de UV/visível da proteína P ₅₇₂ isolada de <i>Dsm. baculatus</i> 9974, na forma nativa.	287
Figura VIII.8. Espectro de UV/visível da proteína P ₅₇₂ isolada de <i>Dsm. baculatus</i> 9974, na forma reduzida.	288
Figura VIII.9. Espectros de RPE da proteína P ₅₇₂ de <i>Dsm. baculatus</i> .	290
Figura VIII.10. Representação esquemática dos diferentes estados de oxidação da subunidade HP da redutase do sulfito de <i>E. coli</i> .	292
Figura VIII.11. Modelo esquemático do centro activo da subunidade HP da redutase do sulfito de <i>E. coli</i> .	293
Figura A.1. Recta de calibração para a determinação da proteína pelo método de Lowry.	304
Figura A.2. Recta de calibração para a determinação do conteúdo em ferro pelo método do TPTZ.	305
Figura A.3. Esquema para a preparação da "sanduíche" para a transferência electroforética para membrana de PVDF.	319

Índice de Tabelas

Tabela II.1. Estados de oxidação dos centros ferro-enxofre.	61
Tabela II.2. Propriedades bioquímicas de algumas proteínas de ferro-enxofre.	81
Tabela II.3. Propriedades espectroscópicas de algumas proteínas de ferro-enxofre.	83
Tabela II.4. Parâmetros usados na simulação dos espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enxofre.	85
Tabela III.1. Caracterização bioquímica de algumas redutases do APS anteriormente descritas.	117
Tabela III.2. Caracterização espectroscópica de algumas redutases do APS isoladas de BRS.	118
Tabela III.3. Parâmetros de Mössbauer para os centros Fe-S da redutase do APS de <i>D. gigas</i> .	119
Tabela IV.1. Composição aproximada dos ácidos aminados da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	131
Tabela IV.2. Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	133
Tabela IV.3. Valores de K_m para o AMP e o sulfito para algumas redutases do APS na presença de ferricianeto e citocromo <i>c</i> .	140
Tabela IV.4. Parâmetros obtidos do ajuste do espectro de Mössbauer da amostra nativa da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> adquirido a 4.2K.	155
Tabela IV.5. Parâmetros obtidos para a simulação do espectro de Mössbauer da amostra semi-reduzida.	159
Tabela IV.6. Valores de potencial de oxidação-redução, a pH 8.0, para a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774.	165

Tabela IV.7. Quantificação dos sinais de RPE, observados pela adição de <i>p</i> HMB à redutase do APS em diferentes estados de oxidação.	178
Tabela V.1. Parâmetros usados na simulação dos espectros de RPE, traçados à temperatura ambiente, do composto modelo preparado em ¹⁴ N e ¹⁵ N.	208
Tabela VII.1. Caracterização físico-química e máximos de absorção da redutase do APS isolada de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	255
Tabela VII.2. Resultados de RPE da redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	256
Tabela VII.3. Propriedades físico-químicas e espectroscópicas da desulforubidina de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	260
Tabela VII.4. Comparação das sequências de ácidos aminados da região NH ₂ -terminal dos citocromos <i>c</i> ₃ isolados de diferentes organismos com o citocromo <i>c</i> ₃ de <i>D. desulfuricans</i> NJ.	267
Tabela VII.5. Características morfológicas, nutricionais e bioquímicas dos géneros <i>Desulfomicrobium</i> e <i>Desulfovibrio</i> .	269
Tabela VIII.1. Composição aproximada de ácidos aminados da proteína P ₅₇₂ isolada de <i>Dsm. baculatus</i> 9974.	283
Tabela VIII.2. Caracterização bioquímica de algumas redutases do sulfito asssimilativas.	294
Tabela VIII.3. Caracterização espectroscópica de algumas redutases do sulfito asssimilativasna forma nativa.	295
Tabela A.1. Soluções "Stock" para a determinação da proteína pelo método de Lowry.	303
Tabela A.2. Soluções "Stock" para a determinação do ferro pelo método do TPTZ."	306
Tabela A.3. Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS.	308
Tabela A.3a. Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS.	309

Tabela A.4. Soluções necessárias para a preparação de um gel de gradiente entre 5 e 20% de acrilamida, na presença de 1 % de SDS.	310
Tabela A.5. Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.	312
Tabela A.5a. Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.	313
Tabela A.6. Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS para posterior transferência electroforética para membrana PVDF.	315
Tabela A.6a. Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS para posterior transferência electroforética para membrana PVDF.	316
Tabela A.7. Soluções "Stock" para a transferência electroforética para membrana de PVDF.	317
Tabela A.8. Soluções "Stock" usadas na determinação da actividade da redutase do APS.	322
Tabela A.9. Potenciais de oxidação-redução, a pH 7.0, dos mediadores usados nas titulações potenciométricas.	326

CAPÍTULO I

A RELEVÂNCIA DO ENXOFRE NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.

A REDUÇÃO DA MOLÉCULA DE SULFATO

I. A relevância do enxofre nos sistemas biológicos. A redução da molécula de sulfato.

1. Introdução	3
2. O ciclo do enxofre	4
3. A oxidação dos compostos de enxofre	6
3.1. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias fototróficas	6
3.2. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias quimiolitotróficas	8
4. A redução dos compostos de enxofre	9
4.1. A redução da molécula de sulfato	11
4.1.1. A redução assimilativa do sulfato	11
4.1.1.1. A via metabólica do PAPS	12
4.1.1.2. A via metabólica do APS	12
4.1.2. A redução dissimilativa do sulfato	13
4.2. A redução de enxofre elementar	17
4.2.1. As eubactérias redutoras de enxofre	18
4.2.2. As arqueobactérias redutoras de enxofre	18
5. As enzimas e as proteínas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato	19
5.1. A sulfurilase do ATP e a pirofosfatase inorgânica	19
5.2. A redutase do APS	21
5.3. As redutases do sulfito	21
5.4. Os citocromos	23
5.5. As hidrogenases	25
5.6. Proteínas de transporte electrónico	27
6. As bactérias redutoras de sulfato	28
6.1. Posição taxonómica das BRS	29
6.2. O impacto ambiental e económico das BRS	31
7. Bibliografia	33

I.1. Introdução

O enxofre encontra-se largamente distribuído na natureza, sendo um dos constituintes essenciais da matéria viva. Na verdade, o enxofre intervém na constituição de moléculas biológicas, tais como os ácidos aminados (cisteína e metionina), algumas coenzimas (biotina, ácido lipoico, tiamina, coenzima A), metabolitos (glutathione) bem como nas macromoléculas derivadas destes. Pensa-se que tenha tido um papel preponderante na evolução química, como aceitador primário de energia. A presença de H_2S na atmosfera primária em concentrações na ordem dos milimolar, poderá ter possibilitado a formação de vários compostos sulfurados voláteis, que por sua vez, poderão ter sido os precursores na síntese de moléculas biológicas importantes, tais como os ácidos aminados ou os tioésteres.¹

O enxofre ocorre predominantemente na sua forma mais oxidada, o sulfato, podendo também existir na forma de compostos orgânicos. A forma reduzido do enxofre, H_2S , está presente na biosfera como o resultado do metabolismo de alguns microrganismos e da actividade vulcânica. A sua concentração é, no entanto, baixa na medida em que na presença de oxigénio é rapidamente oxidado, quer espontaneamente, quer pela acção das bactérias.

A conversão biológica dos compostos de enxofre traduz-se no ciclo do enxofre. Os aspectos biológicos deste ciclo estão ilustrados na Figura I.1. Para além das transformações biológicas do enxofre, outras não menos importantes ocorrem na atmosfera terrestre, envolvendo algumas formas gasosas de enxofre.

1.2. O ciclo do enxofre

O ciclo do enxofre é um dos principais ciclos biológicos e é constituído por uma série de reacções de oxidação que produzem sulfato a partir das formas reduzidas de enxofre, tais como o $S_2O_3^{2-}$, S^0 , e S^{2-} , e por reacções de redução que envolvem a formação de sulfureto a partir da molécula de sulfato. Todas as reacções deste ciclo envolvem vias metabólicas sequenciais, mediadas por diversos agentes biológicos.²

O sulfato, a forma mais oxidada do enxofre, é universalmente usado como nutriente pelas plantas e microrganismos. Para que possa ser incorporado nos compostos orgânicos tem que ser reduzido, dado que nos organismos vivos ocorre quase exclusivamente nas formas -SH ou -S-S-. Do ponto de vista fisiológico, o sulfato pode assumir-se como aceitador final de electrões, num processo denominado *redução dissimilativa do sulfato* levado a cabo pelas bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato; ou pode ser reduzido a sulfureto, *redução assimilativa do sulfato*, para posterior incorporação nos processos biossintéticos dos ácidos aminados sulfurados (cisteína e metionina). Este último processo é utilizado pelas plantas, algas, fungos e outros organismos procarióticos mas não pelos animais, pelo que estes se encontram dependentes das plantas e microrganismos em relação à fonte de compostos de enxofre reduzido.³

A molécula de sulfato é relativamente inerte e, por isso, tem que ser activada antes de ser reduzida ou incorporada nas vias biossintéticas. O sistema de activação do sulfato é constituído por duas enzimas: a sulfurilase do ATP, que catalisa a reacção de conversão do sulfato na sua forma activada, o sulfato de adenilil (APS), com a libertação de pirofosfato inorgânico (PPi), e a cinase do APS que medeia a fosforilação do APS para produzir sulfato 3'-fosfoadenilil (PAPS). Uma terceira enzima está presente em alguns organismos, a sulfurilase do ADP, mas não se sabe de que modo intervém na formação do PAPS. Esta molécula serve, então, de substrato a todas as sulfotransferases que catalisam a formação de ésteres de sulfato e a algumas sulfotransferases de grupos tiol, envolvidas na redução assimilativa do sulfato.^{3,4}

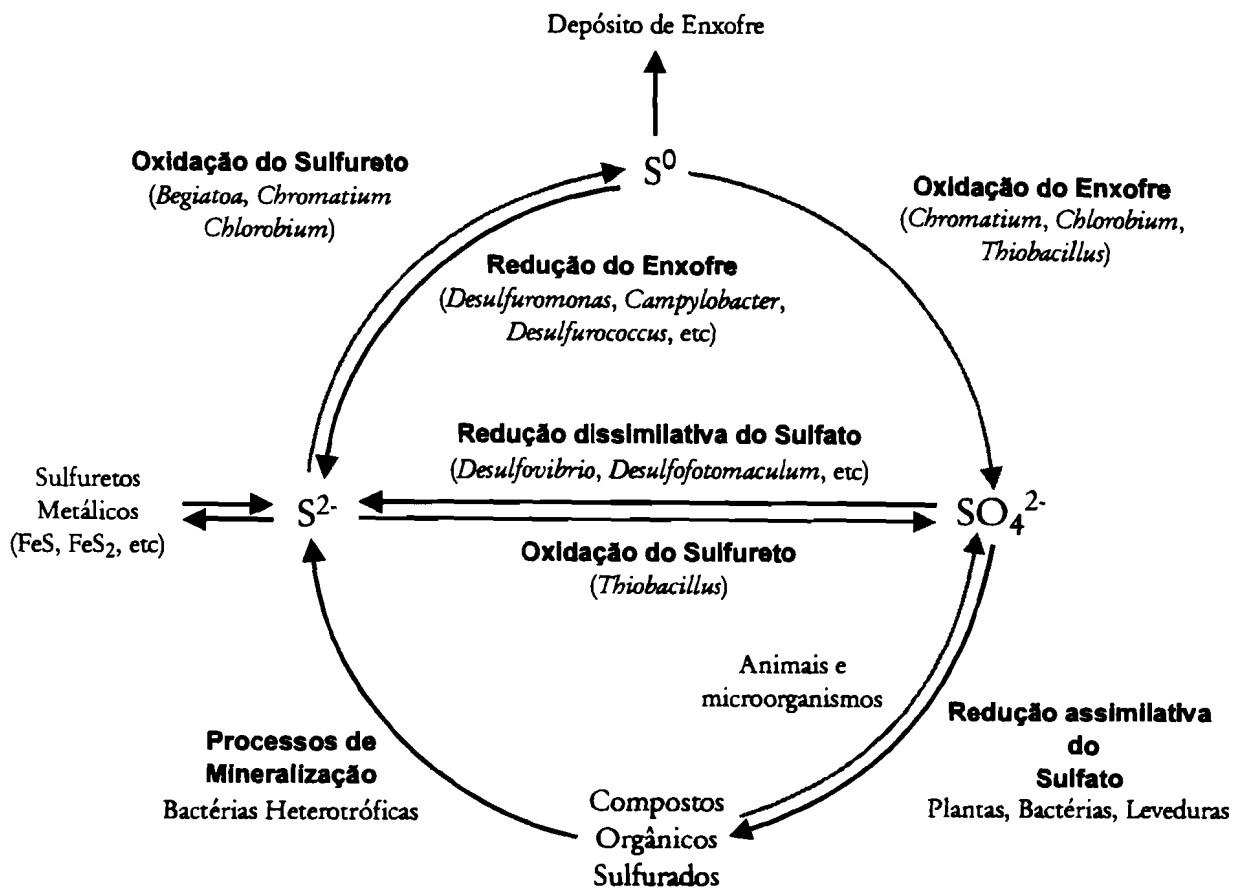


Figura I.1. O ciclo do enxofre. O sulfato (SO_4^{2-}) é reduzido a sulfureto (S^{2-}) pelas bactérias redutoras de enxofre através da redução dissimilativa do sulfato. O S^{2-} produzido é usado como substrato, pelas bactérias oxidantes de sulfureto (bactérias litotróficas), que o podem oxidar até ao nível do sulfato, via a formação de enxofre elementar (S^0). Na redução assimilativa do sulfato dá-se a formação de compostos sulfurados que são incorporados nas proteínas sob a forma de ácidos aminados. Por sua vez, as proteínas sofrem degradação, através de processos de proteólise e mineralização, e os compostos sulfurados são reconvertidos a sulfureto. A redução de enxofre contribui também para a acumulação de sulfuretos, que maioritariamente precipitam sob a forma de compostos metálicos de enxofre (Adaptado das referências 5 e 6).

Quando os compostos orgânicos sulfurados são mineralizados, o enxofre é libertado sob a forma de H_2S , que também pode ser gerado pela decomposição e putrefacção dos constituintes da célula. O H_2S que é produzido na biosfera como resultado da decomposição de compostos sulfurados, da redução do sulfato e da actividade vulcânica, é reconvertido a sulfato, quer pela acção da luz, quer pela actividade dos microrganismos. Apenas uma pequena parte destes compostos é sequestrada sob a forma de sulfuretos insolúveis, ou após a oxidação espontânea, convertida a enxofre elementar.

A oxidação biológica do H_2S e do enxofre elementar é efectuada pelas bactérias fotossintéticas e pelas bactérias quimioautotróficas e origina a libertação de H_2SO_4 conduzindo a uma acidificação do meio. Este processo tem implicações graves na agricultura e provoca a corrosão das rochas e dos monumentos.

I.3. A oxidação dos compostos de enxofre

A oxidação das formas reduzidas dos compostos de enxofre envolve várias reacções que são levadas a cabo por uma série de microrganismos. Os organismos dependentes da oxidação de compostos de enxofre, para a obtenção de energia ou de poder redutor, são designados por microrganismos litotróficos. De entre estes, distinguem-se os que são dependentes da luz, os organismos fototróficos, e os que utilizam a energia libertada pela oxidação dos compostos inorgânicos, os quimiolitotróficos. Os organismos quimiolitotróficos podem ser estritos, facultativos ou heterotróficos.

I.3.1. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias fototróficas

De entre o grupo de organismos que oxidam compostos de enxofre em condições anaeróbicas, destacam-se as bactérias fotossintéticas pertencentes aos géneros *Chlorobium* e *Chromatium*. Estas, usam o sulfureto como dador de electrões no processo de fixação de dióxido de carbono, na presença de luz.⁷

O género *Chlorobium* é constituído por um grupo de organismos estritamente anaeróbicos que podem ser isolados de nichos ecológicos com elevada concentração de H_2S (lamas dos oceanos ou lagos). São, muitas vezes, designados por bactérias verdes devido à sua intensa cor esverdeada que se deve à presença de pigmentos de clorofila. As duas espécies melhor caracterizadas são as bactérias *Chlorobium limicola* e *Chlorobium thiosulphatophilum*. A primeira espécie tem a capacidade de usar sulfureto e enxofre elementar como dadores de electrões; o sulfureto é oxidado a sulfato ou a enxofre elementar que é precipitado extracelularmente. Para além dos dadores electrónicos acima referidos, a bactéria *Chlorobium thiosulphatophilum* pode também utilizar tiosulfato ou tetracionato, que são completamente oxidados a sulfato.^{7,8}

Pouco é conhecido acerca do mecanismo envolvido na oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias do género *Chlorobium*. No entanto, sabe-se que, durante este processo, ocorre a acumulação de enxofre elementar.

As bactérias pertencentes ao género *Chromatium* são designadas por bactérias púrpuras, por conterem carotenóides que, conjuntamente com a clorofila, lhes confere a sua coloração. São bactérias anaeróbicas, estritamente fotossintéticas que exibem uma variedade de formas morfológicas, incluindo a ovóide, esférica, ou a forma de bastonete. Têm a capacidade de oxidar sulfureto, tiosulfato e enxofre elementar, que é dependente da presença de dióxido de carbono. Durante o processo de oxidação de sulfureto e tiosulfato há, normalmente, a produção de enxofre elementar, que é acumulado intracelularmente. A produção de enxofre elementar a partir de sulfureto e de tiosulfato sugere que a molécula de tiosulfato é partida em duas moléculas compostas por um só átomo de enxofre. Esta hipótese é apoiada pelo facto de nestas espécies ter sido purificada uma enzima que apresenta actividade de redutase do tiosulfato.^{9,10}

De um modo geral, pensa-se que as bactérias dos géneros *Chlorobium* e *Chromatium* possuem as enzimas redutase do APS, redutase do sulfito, sulfurilase do ADP e alguns citocromos. Os electrões obtidos pela oxidação de compostos de enxofre são, geralmente, aceites por moléculas de citocromos que os transferem posteriormente aos

sistemas receptores das reacções fotossintéticas ou das vias de redução de nucleotídeos piridínicos.^{7,8}

1.3.2. A oxidação de compostos de enxofre pelas bactérias quimiolitotróficas

Os organismos quimiolitotróficos que oxidam compostos de enxofre reduzido são essencialmente representados pelos organismos pertencentes aos géneros *Thiobacillus* e *Thiomicrospira*. Estes organismos podem ser estritamente autotróficos, com capacidade de crescer na presença de compostos de enxofre inorgânico reduzidos, tais como o sulfureto, tiosulfato, ou enxofre elementar, e de dióxido de carbono. O metabolismo do carbono das espécies do género *Thiobacillus* é semelhante ao das bactérias fotossintéticas. As formas facultativas, capazes de se adaptarem a meios auto ou heterotróficos obtêm a energia do mesmo modo e estão incluídas nos géneros *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix* e *Paracoccus*.^{7,11}

O género *Thiobacillus* foi primeiramente identificado em 1902 e até à data várias espécies têm sido estudadas no sentido de elucidar os mecanismos de obtenção de energia. Presentemente existem evidências indicativas de que este género não é homogéneo em termos de mecanismos de oxidação de compostos de enxofre e modos de obtenção de energia. Vários mecanismos têm sido propostos que se baseiam, essencialmente, no tipo de enzimas envolvidas e de intermediários produzidos por estes organismos. Dois destes mecanismos são descritos para as espécies *T. versutus* e *T. tepidarius*.⁸

O primeiro mecanismo envolve a oxidação do composto de enxofre reduzido a sulfato, sem a formação de compostos intermediários, ocorrendo no espaço periplasmático. Na bactéria *T. versutus* as enzimas oxidoredutase do tiosulfato:citocromo c, que converte o tiosulfato em tetrionato, e a enzima redutase do APS parecem não estar presentes. Contrariamente à maioria das espécies de *Thiobacillus*, este organismo não produz nem metaboliza politionatos.^{12,13} Recentemente, Beffa e colaboradores contrariaram esta hipótese, provando que nesta espécie, o enxofre elementar constitui um importante

intermediário na oxidação do tiosulfato. O que observaram, sugere que a oxidação do S^0 permite um rendimento energético superior.¹⁴

O segundo mecanismo proposto para a obtenção de energia dos organismos de *Thiobacillus*, exemplificado pela bactéria *T. tepidarius*, difere do primeiro ao nível da produção e acumulação de politionatos. Contrariamente ao que ocorre em *T. versutus*, neste mecanismo alguns dos compostos sulfurados são, provavelmente metabolizados no citoplasma. A bactéria pode converter o tiosulfato em tetracionato, em quantidades estequiométricas pela acção da oxidoreductase do tiosulfato:citocromo *c*. A subsequente oxidação do tetracionato parece requerer a interacção com a membrana citoplasmática e o possível transporte na célula. É assumido que o tetracionato constitui o intermediário produzido em maior quantidade e que a sua oxidação está acoplada à redução do citocromo *b*. Pensa-se também que alguns substratos possam estar envolvidos em reacções com componentes da membrana ou com enzimas citoplasmáticas, nomeadamente a redutase do APS e a sulfurilase do ADP.^{8,12} Neste mecanismo poderá estar envolvida a formação de APS pela acção da redutase do APS, a partir de sulfito e AMP. O APS seria seguidamente convertido a ATP/ADP e sulfato pela acção das enzimas sulfurilase do ATP/ADP ou cinase do APS.^{8,15,16}

Na Figura I.2 é apresentado um sumário dos mecanismos hipotéticos para a oxidação dos compostos de enxofre nos organismos do género *Thiobacillus*.

I.4. A redução dos compostos de enxofre

A capacidade de reduzir compostos de enxofre é muito frequente nas bactérias, plantas e algumas leveduras, constituindo uma das mais importantes reacções do ciclo do enxofre.

A redução da molécula de sulfato é, de longe, o processo de redução mais significativo da parte redutora do ciclo do enxofre. Como anteriormente referido, podem considerar-se duas vias de redução: a via assimilativa e a via dissimilativa.

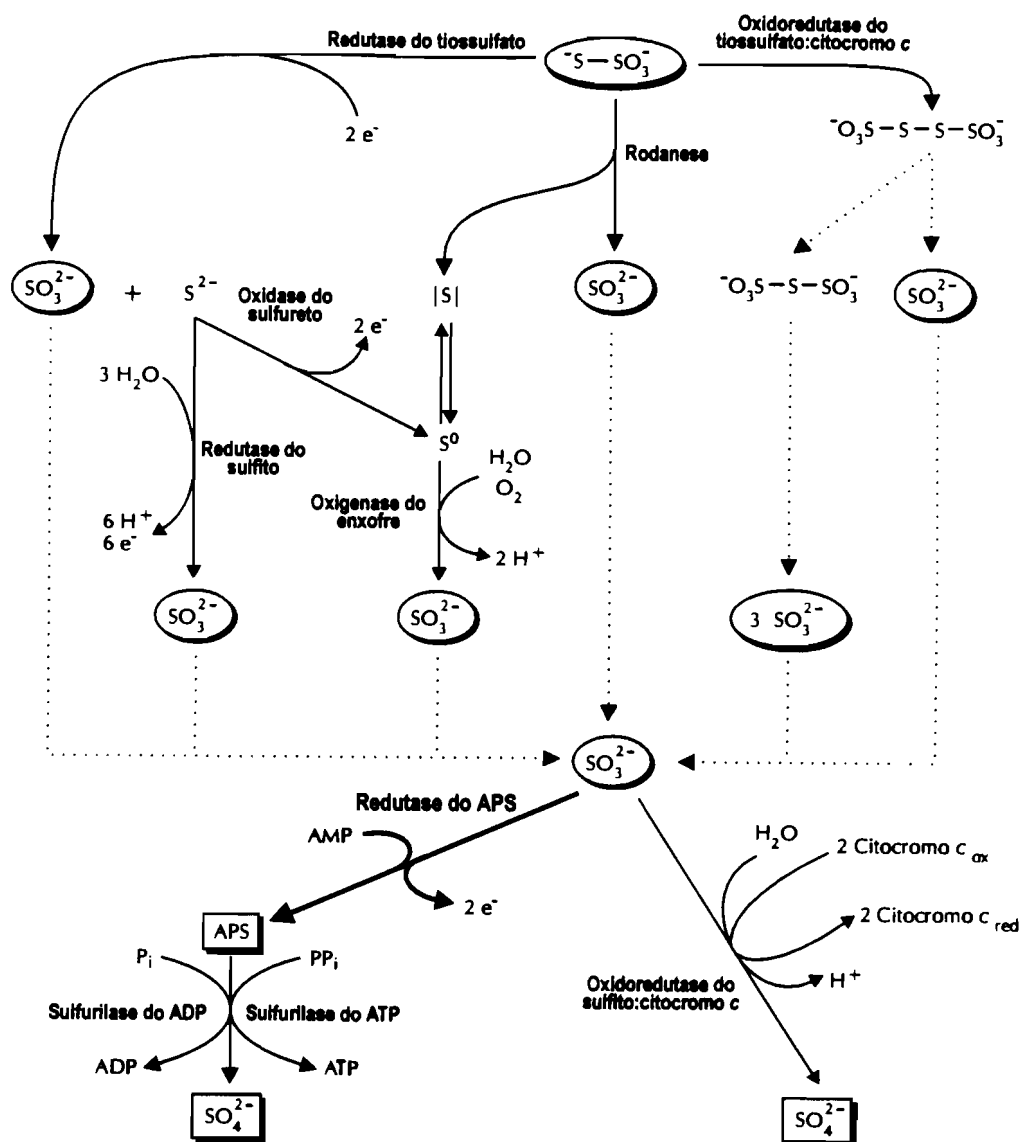


Figura I.2. Representação esquemática dos hipotéticos mecanismos de oxidação de compostos de enxofre em organismos do género *Thiobacillus*. Como exemplo é usado o sulfato como substrato (adaptado da referência 8).

As duas vias têm em comum algumas enzimas, co-factores e grupos prostéticos, que são usados na activação ou redução dos compostos de enxofre. No entanto, a via assimilativa, que tem como objectivo a produção de moléculas sulfuradas, tais como alguns ácidos aminados e co-factores, é regulada de tal modo que, em condições normais, não há

acumulação do produto final, o sulfureto. Contrariamente, a segunda via é realizada para satisfazer as necessidades energéticas. É levada a cabo pelas bactérias redutoras de sulfato que, normalmente, o reduzem até ao nível do sulfureto, à custa de uma variedade de enzimas e transportadores electrónicos. A via dissimilativa implica a formação de grandes quantidades de sulfureto durante o processo de produção de ATP.

I.4.1. A redução da molécula de sulfato

I.4.1.1. A redução assimilativa do sulfato

A redução assimilativa da molécula de sulfato é levada a cabo por um grande número de plantas e bactérias, com a finalidade de satisfazer as necessidades nutricionais em compostos sulfurados.

A reacção básica do processo assimilativo, que diferencia esta via da redução dissimilativa, envolve a transferência de um grupo sulfonato para um grupo tiol com formação de um nucleotídeo e de tiosulfonato. Dependendo da origem do grupo sulfonato, APS ou PAPS, é possível descrever duas vias de redução assimilativa do sulfato a sulfito: *i)* a via metabólica do PAPS que produz PAP na presença de NADPH e envolve a enzima oxidoreductase do sulfito na reacção de redução da molécula de sulfito a sulfureto, e *ii)* a via metabólica do APS na qual é libertado AMP e que envolve a enzima redutase do sulfonato. A reacção global inclui as duas vias e pode ser escrita do seguinte modo:¹⁷



O grupo tiol poderá ser um composto de baixa massa molecular tal como a glutathiona ou uma proteína, tal como a tiorredoxina ou a glutarredoxina.¹⁸

I.4.1.1.1. A via metabólica do PAPS

Esta via ocorre na maioria das eubactérias, leveduras e fungos, envolvendo uma série de reacções enzimáticas. Após a activação da molécula de sulfato pela sulfúrilase do ATP, a molécula de APS é fosforilada na posição 3' na presença de ATP, com formação de PAPS e de ADP. A reacção é catalisada pela cinase do APS. De seguida, dá-se a transferência do grupo sulfato do PAPS para a molécula receptora, por uma reacção de oxidação-redução intramolecular, originando uma mudança de valência do enxofre de +6 para +5. Subsequentemente, há a formação de sulfito (e em determinados casos, dissulfureto) produzido por uma reacção espontânea de oxidação-redução intramolecular.^{8,12,17,19}

A molécula de sulfito pode ser, por sua vez, directamente reduzida a sulfureto por um processo que envolve a transferência de seis electrões e que é mediado por uma redutase do sulfito.^{20,21} O aceitador do grupo tiol é regenerado por redução da ponte dissulfureto, na presença de NADPH, por uma oxidoreductase.

A redução assimilativa é controlada pela indução e repressão das enzimas envolvidas, assim como por retro-inibição.

I.4.1.1.2. A via metabólica do APS

A via metabólica do APS é um processo que ocorre em plantas verdes (provavelmente nas mitocôndrias), algas, e em algumas bactérias fotossintéticas.^{22,23,24,25} As duas vias de redução assimilativas, como já foi dito, diferem na sua especificidade para o APS ou PAPS e na natureza da molécula receptora do grupo tiol. O processo global da redução assimilativa pela via do APS difere da anterior, essencialmente, na formação de um tiosulfonato em vez de sulfito. Esta reacção irreversível é catalisada por uma enzima, denominada sulfotransferase do APS:tiol, que apresenta uma elevada especificidade para o APS. Em algumas plantas verificou-se que a actividade da sulfotransferase do APS:tiol é regulada pelos produtos finais da reacção, o H₂ e/ou cisteína. O prosseguimento da via metabólica do APS depende da formação de PAPS que parece ser um precursor do APS.

No caso de algumas algas verdes, pensa-se que a molécula receptora do grupo tiol seja a glutathiona.²⁶ O produto da reacção, o tiosulfonato de glutathiona, é reduzido até à forma de sulfureto (GSSH) por uma redutase do tiosulfonato que é dependente de uma ferredoxina reduzida.²⁷ A reacção da molécula de GSSH com a *o*-acetil-L-serina, o indutor interno do operão da cisteína, na presença da enzima sulfidrilase da *o*-acetil-L-serina, resulta na formação do ácido aminado, L-cisteína.^{26,27,28}

I.4.1.2. A redução dissimilativa do sulfato

A capacidade de levar a cabo a redução dissimilativa da molécula de sulfato está limitada e é característica de um grupo vasto e diversificado de organismos procarióticos, denominado bactérias redutoras de sulfato. Este grupo de microrganismos estritamente anaeróbicos inclui alguns géneros de eubactérias Gram-negativas, tais como *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfomicrobium* (anteriormente classificado como pertencente ao género *Desulfovibrio*), *Desulfococcus*, e *Desulfosarcina*; as eubactérias Gram-positivas esporulentas do género *Desulfotomaculum*; assim como um género de Archaeobactéria, *Achaeoglobus*.^{29,30} Embora estes microrganismos existam em ambientes variados, apresentem morfologias diferentes e as suas capacidades metabólicas sejam distintas, todos eles usam o sulfato como aceitador final de electrões produzindo, consequentemente, elevadas quantidades de sulfureto.

Por analogia com a respiração nos organismos aeróbicos, este processo é também conhecido como respiração anaeróbica, uma vez que o oxigénio é substituído pelo sulfato sendo, de longe, o processo de redução mais importante do ciclo do enxofre. A via da redução dissimilativa do sulfato envolve, no mínimo, quatro enzimas: a sulfurilase do ATP (transferase do sulfato de adenilil), uma pirofosfatase inorgânica, a redutase do APS e uma, ou um conjunto, de redutases do sulfito (Figura I.3).^{8,31}

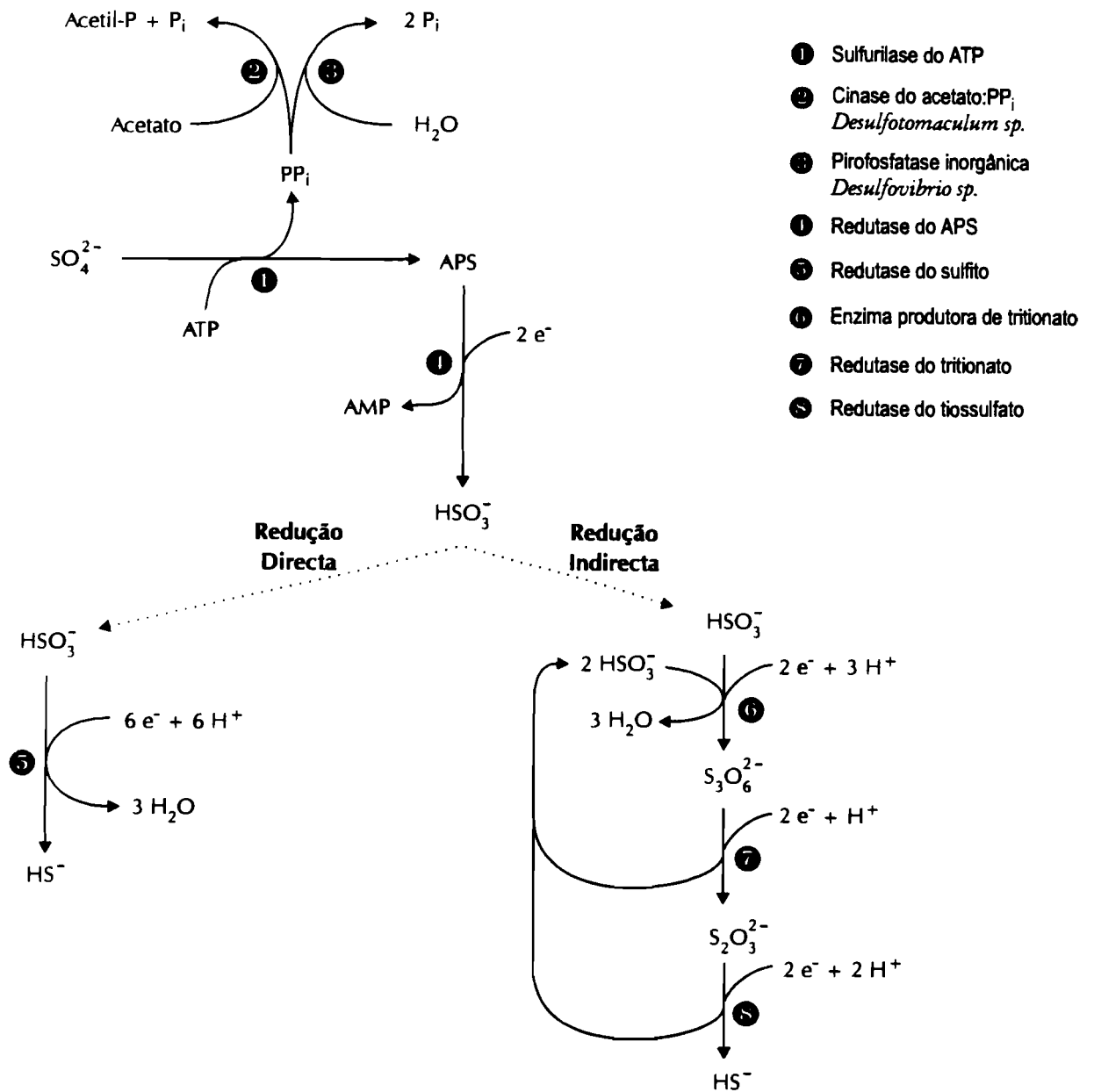
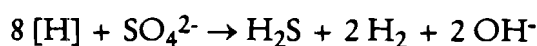


Figura I.3. A redução dissimilativa do sulfato (adaptado da referência 31).

O processo global da redução dissimilativa da molécula de sulfato é descrito pela equação:



Os dadores de hidrogénio podem ser alcoóis, ácidos orgânicos (como por exemplo o piruvato ou o lactato), ou o hidrogénio molecular.

O primeiro passo da redução consiste na activação da molécula de sulfato e é comum à via da redução assimilativa. A reacção requer uma mole de ATP e é catalisada pela enzima sulfurilase do ATP.^{7,32} Os produtos da reacção de activação são o APS e o pirofosfato inorgânico (PPi). O equilíbrio da reacção não é favorável à formação de APS ($K_{\text{eq}} \sim 10^{-8}$) e, pensa-se que para deslocá-lo na direcção oposta seja necessário remover o PPi do meio. Em muitos organismos, nomeadamente nas bactérias do género *Desulfovibrio*, o consumo de PPi faz-se através de uma pirofosfatase que o hidrolisa em duas moléculas de fosfato inorgânico (Pi). Em algumas espécies do género *Desulfotomaculum*, o PPi gerado durante a activação do sulfato é usado na fosforilação do acetato por acção de uma cinase de acetato:PPi produzindo acetil-P, que por sua vez está envolvido na reacção de fosforilação do ADP a ATP.³³ Seguidamente a molécula de APS é reduzida pela redutase do APS, produzindo AMP e sulfito (sob a forma de HSO_3^-).³⁴ Esta reacção é reversível o que explica a presença desta enzima em organismos oxidantes de compostos de enxofre.

O passo final referente à redução do sulfito a sulfureto é uma questão controversa, tendo sido propostos dois mecanismos para a redução do sulfito. O primeiro, defende a redução hexaelectrónica do sulfito até ao nível do sulfureto, num passo único, sem a formação de qualquer intermediário.^{35,36} No segundo mecanismo, a passagem do sulfito a sulfureto faz-se em três passos sequenciais de dois electrões, envolvendo a formação de tritionato e tiosulfato como intermediários reais da redução dissimilativa.^{37,38,39} Algumas evidências tem sido apresentadas que apoiam a ocorrência da redução directa do sulfito. Embora tenha sido possível isolar individualmente as enzimas envolvidas na segunda hipótese (as redutases do tritionato e do tiosulfato), pensa-se que fisiologicamente, a

reacção é catalisada por uma única enzima, com a formação de uma série de compostos intermediários relativamente estáveis.^{40,41} Nas bactérias de *Desulfovibrio*, a enzima desulfoviridina apresenta actividade de redutase do sulfito, reduzindo-o num só passo a sulfureto. Dependendo das condições de crescimento, a enzima pode, também, catalisar a formação de tritionato e tiosulfato. Apesar das evidências que apoiam o primeiro mecanismo, a possibilidade da ocorrência da segunda via tem sido sugerida por vários investigadores.⁴²

A presença de sulfito como um intermediário da redução do sulfato não foi demonstrada, pelo facto de nunca ter sido detectada a sua acumulação nos meios de crescimento das bactérias redutoras de sulfato.³¹ Contudo, a concentração celular das enzimas redutase do APS e redutase do sulfito parece ser de 1:1, apoiando a hipótese do sulfito ser um substrato da redutase do sulfito.

O processo de redução dissimilativa de sulfato, como anteriormente referido, envolve o consumo de ATP, que tem que ser regenerado. A síntese de ATP ocorre, principalmente, através de um processo de fosforilação oxidativa acoplada ao transporte electrónico. Neste processo dá-se a redução de alguns co-factores, como por exemplo NAD e FAD, que são posteriormente reoxidados pela acção de oxidases.^{43,44} Estas reacções de oxidação originam a transferência de protões do interior para o exterior da célula, criando um gradiente protónico e electrónico através da membrana celular. A dissipação destes gradientes regula o funcionamento das sintetases do ATP (ATPases), bem como uma variedade de outras funções, tais como a rotação flagelar que permite a mobilidade ou o transporte de compostos (nutrientes ou produtos do metabolismo) para dentro e/ou fora da célula.

Nas bactérias redutoras de sulfato, foram propostos dois mecanismos para a transferência de energia acoplada ao transporte electrónico.³¹ Um dos mecanismos baseia-se em estudos efectuados na bactéria *D. vulgaris* Marburg, que cresce em meios que contêm H₂ e SO₄²⁻ ou tiosulfato. Este mecanismo propõe que os electrões usados na redução da molécula de sulfato (no citoplasma) são produzidos pela oxidação de H₂ pela hidrogenase,

no espaço periplasmático.⁴⁵ Os electrões gerados são transportados ao longo da membrana celular através de proteínas membranares, sendo posteriormente usados para reduzir o SO_4^{2-} . O mecanismo alternativo, baseado em estudos em bactérias heterotróficas redutoras de sulfato, defende que os electrões produzidos pela oxidação de compostos de carbono são usados na redução de H_2 , no interior da membrana.⁴⁶ O hidrogénio é uma molécula permeável e difunde rapidamente através da membrana citoplasmática. Do lado externo da membrana, no espaço periplasmático, a molécula de H_2 é reoxidada a H^+ pela acção de uma hidrogenase, que requer a presença de citocromo c_3 . Os electrões produzidos nesta oxidação são transportados para o interior do citoplasma, onde são usados na reacção de redução dissimilativa do sulfato. Estas translocações de prótons resultam na formação de um gradiente de pH através da membrana que regula a síntese de ATP, via as sintetases do ATP convencionais.

Do que foi escrito anteriormente, é evidente a complexidade dos processos bioenergéticos nas bactérias redutoras de sulfato. O hidrogénio tem um papel importante nos processos de conservação de energia. O hidrogénio produzido pela hidrogenase no citoplasma é utilizado pelas hidrogenases periplasmáticas na redução do sulfato, constituindo o chamado ciclo do H_2 .

I.4.2. A redução de enxofre elementar

A redução dissimilativa do enxofre foi pela primeira vez referida, por Biebl e Pfennig em 1977, para descrever um grupo de bactérias com capacidade de usar o enxofre elementar como aceitador final de electrões.⁴⁷ Os organismos redutores de enxofre dividem-se em dois grandes grupos: as eubactérias e as arqueobactérias.

I.4.2.1. As eubactérias redutoras de enxofre

As eubactérias redutoras de enxofre subdividem-se, por sua vez, em dois grupos: os organismos facultativos e os obrigatórios.⁴¹

O primeiro grupo inclui os organismos facultativos que, na ausência de outros aceptadores de electrões, obtêm a energia necessária para seu crescimento a partir da redução dissimilativa do enxofre elementar. São representados por organismos com características diferentes: i) as bactérias mesofílicas, que englobam as espiriladas, que utilizam hidrogénio ou formato como dadores de electrões (*Spirillum* 5175, *Campylobacter* spp. e *Wolinella succinogenes*) e as bactérias redutoras de sulfato, nomeadamente algumas espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*, incluindo entre outras, *D. gigas*, *D. desulfuricans*, *D. multispirans*, *D. fructosovorans* e, ii) as eubactérias termofílicas redutoras de enxofre, tal como as bactérias *Thermotoga maritima* e *Thermotoga neopolitana*.

O segundo grupo de eubactérias diz respeito aos organismos redutores de enxofre obrigatórios, que são representados pelos microrganismos anaeróbicos pertencentes ao género *Desulfuromonas*. Estes organismos são capazes de crescer em acetato como única fonte de carbono orgânico, à custa da respiração anaeróbica em que a oxidação do acetato a CO₂ está estequiometricamente associada à redução dissimilativa do S⁰, com formação de H₂S.⁴⁸ O género *Desulfuromonas* (*Drm.*) contém duas espécies: *Drm. acetoxigenes* e *Drm. succinoxidans*. A maioria destes microrganismos pode crescer na ausência de enxofre elementar, substituindo-o por fumarato, malato ou compostos orgânicos com pontes dissulfureto (cistina ou glutatona oxidada).

I.4.2.2. As arqueobactérias redutoras de enxofre

Do ponto de vista filogenético, as arqueobactérias estão agrupadas no terceiro reino.⁹⁴ Estão classificadas em três ordens: as bactérias metanogénicas, as bactérias extremamente halofílicas e as bactérias termofílicas redutoras de enxofre. Com a excepção

dos organismos halófilos, os outros grupos de arqueobactérias são capazes de metabolizar enxofre elementar.

Até à relativamente pouco tempo, pensava-se que as bactérias metanogénicas apenas requeriam compostos de enxofre reduzidos, tais como sulfureto, metionina ou cisteína, para as suas necessidades nutricionais.⁴⁹ Presentemente, sabe-se que para além destes compostos, as bactérias metanogénicas podem utilizar outras formas de enxofre, mas apenas na presença de resíduos de sulfureto. A capacidade de usar sulfito ou tiosulfato, ou enxofre elementar, como fonte única de enxofre, parece ser frequente nos organismos metanogénicos.^{50,51}

As arqueobactérias termofílicas redutoras de enxofre são isoladas das partes aquosas de vulcões, onde a temperatura atinge valores da ordem dos 95 °C. A temperatura inferiores a 60 °C não se observa crescimento destes microrganismos. São, na maioria, organismos anaeróbicos obrigatórios, apesar de se poderem encontrar espécies aeróbicas ou anaeróbicas facultativas.

1.5. As enzimas e as proteínas envolvidas na redução dissimilativa do sulfato

Como anteriormente referido a redução dissimilativa do sulfato envolve, no mínimo, quatro enzimas citoplasmáticas: 1) a sulfurilase do ATP; 2) a pirofosfatase inorgânica; 3) a redutase do APS; 4) a redutase do sulfito. Para além destas enzimas, este processo requer um conjunto de proteínas de transporte electrónico que fornecem os electrões necessários às redutases (Figura I.4).

1.5.1. A sulfurilase do ATP e a pirofosfatase inorgânica

A sulfurilase do ATP é a enzima que catalisa a reacção de activação da molécula de sulfato. É responsável pela hidrólise de ATP em AMP, para o qual é transferido o grupo sulfato. Os produtos resultantes desta reacção são o APS, que corresponde à forma activada do sulfato e pirofosfato inorgânico.

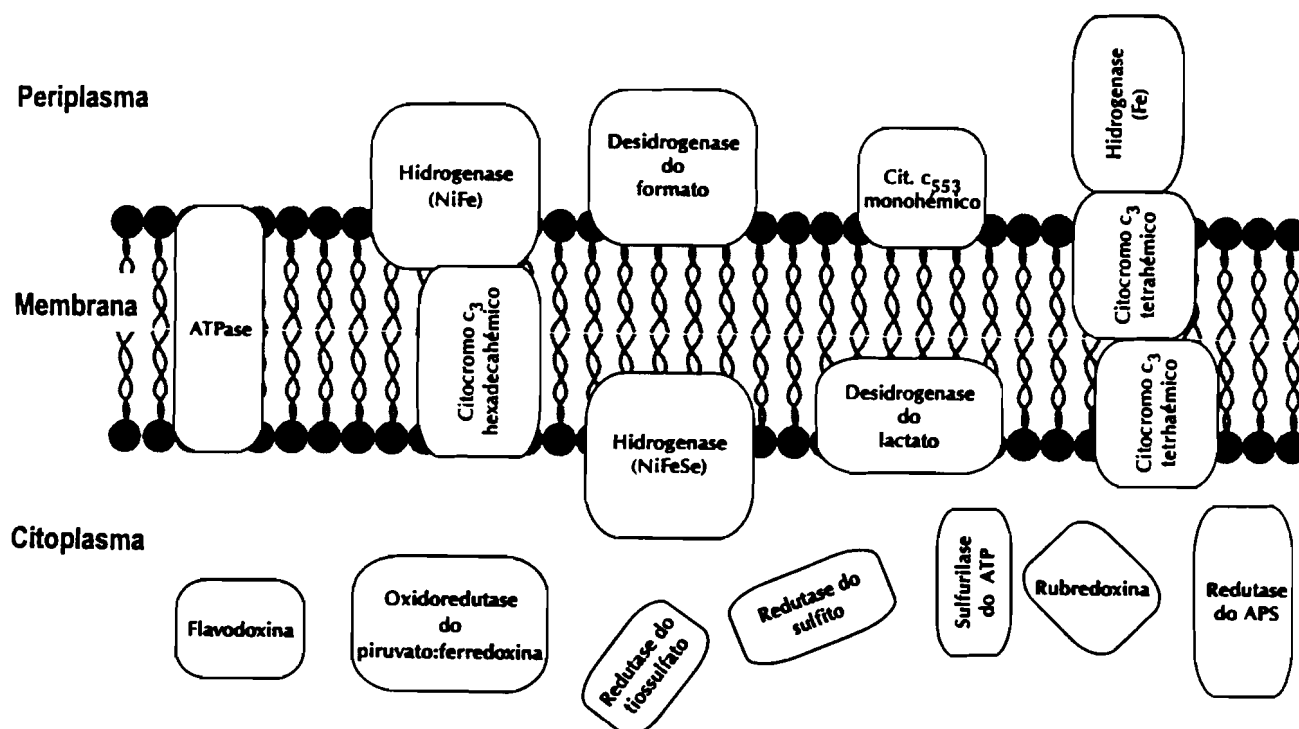
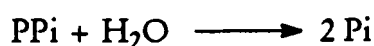


Figura I.4. Localização celular das enzimas e proteínas de transporte electrónico na bactéria redutora de sulfato *D. vulgaris* (adaptado da referência 52).

Como foi dito, esta reacção de activação não é termodinamicamente favorável, pelo que é necessária a presença de uma pirofosfatase inorgânica que hidrolisa o pirofosfato em duas moles de fosfato inorgânico.

As reacções catalisadas por estas duas enzimas podem ser representadas pelas seguintes equações:



A sulfurilase do ATP deverá estar presente em todos os organismos que levam a cabo a redução dissimilativa do sulfato, no entanto, a sua presença apenas foi demonstrada em algumas espécies. Foi detectada em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Desulfovibrio*

O metabolismo do enxofre *desulfuricans*, *Desulfotomaculum nigrificans* e provavelmente em *Desulfovibrio gigas*, tendo sido parcialmente purificada de *D. desulfuricans* e de *Desulfotomaculum nigrificans*.^{32,53}

A pirofosfatase inorgânica foi isolada de *D. vulgaris* Hildenborough e *D. desulfuricans* Berre-eau, da bactéria *Thiobacillus denitrificans* e da arqueobactéria *Archeoglobus fulgidus*. Foi também detectada em outras bactérias redutoras de sulfato.^{54,55,56,57}

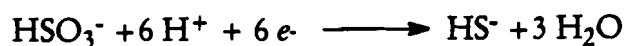
I.5.2. A redutase do APS

A redutase do APS é uma das enzimas-chave da redução dissimilativa do sulfato. Catalisa a redução reversível da molécula de APS com formação de sulfito e libertação de AMP. Está presente em todas as bactérias redutoras de sulfato identificadas até à data, podendo ocorrer também em alguns organismos fototróficos e em bactérias que oxidam compostos de enxofre reduzido.

As características gerais das redutases do APS até agora isoladas serão revistas no capítulo III desta tese. Nos capítulos IV e VI serão apresentadas as propriedades bioquímicas e espectroscópicas das redutases isoladas de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e *Thiobacillus denitrificans*, respectivamente, uma bactéria anaeróbica redutora de enxofre e uma bactéria que oxida compostos de enxofre. No capítulo VII será, também, descrita a caracterização preliminar da redutase do APS purificada de *D. desulfuricans* New Jersey, uma bactéria redutora de sulfato isolada de materiais corroídos.

I.5.3. As redutases do sulfito

As redutases do sulfito catalisam a redução hexaelectrónica do sulfito a sulfureto:



Nota: o pH correspondente à actividade óptima destas enzimas é mais ácido, daí o substrato se encontrar na forma de ião bissulfito, HSO₃⁻.

Com base no estado de spin do grupo hémico que contém, distinguem-se duas classes de redutases do sulfito. A primeira classe compreende as redutases de spin alto, (também designadas por redutases do sulfito dissimilativas, que apresentam uma massa molecular elevada e uma estrutura complexa. Nesta são conhecidas quatro redutases do sulfito, que foram identificadas com base no seu espectro de UV/visível, no espectro de RPE e no comportamento do grupo hémico^{58,59,60}: 1) a desulfovirdina (cor esverdeada); 2) a desulforubidina (cor avermelhada); 3) P₅₉₀ (cor castanha) e 4) desulfofúscidina (coloração castanho-avermelhada).⁴¹ As duas primeiras enzimas encontram-se nas bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio* e *Desulfomicrobium*, respectivamente; o P₅₉₀ foi isolado das espécies pertencentes ao género *Desulfotomaculum*, e a desulfofúscidina está associada aos organismos termofílicos de género *Thermodesulfobacterium*.^{61,62,63,64} De um modo geral, são proteínas constituídas por três subunidades com uma estrutura do tipo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, com uma massa molecular total que varia entre 170 e 225 kDa. As redutases do sulfito dissimilativas contêm grupos sirohemo e agregados [4Fe-4S] como grupos prostéticos. Os seus espectros de visível e de RPE evidenciam a presença de grupos hémicos de spin alto, que se encontram magneticamente acoplados aos centros de ferro- enxofre.⁶⁵ Caracterizam-se pela sua capacidade de catalisar irreversivelmente a formação de compostos intermediários, tais como o tritionato ou o tiosulfato. No entanto, o papel destas reacções na redução dissimilativa do sulfato não é claro.

A segunda classe é representada pelas redutases do sulfito de baixa massa molecular, também denominadas redutases do sulfito assimilativas, sendo constituídas por uma única cadeia polipeptídica. As redutases do sulfito assimilativas descritas até à data foram isoladas de *D. vulgaris* Hildenborough, *Desulfuromonas acetoxidans* e *Methanosarcina barkeri* DSM 800.^{66,67,68} A sua massa molecular está compreendida entre 23 e 27 kDa e, normalmente possuem apenas um grupo sirohemo e um agregado [4Fe-4S].⁶⁹ Tal como as redutases do tritionato e do tiosulfato, não é conhecida o papel destas enzimas no metabolismo do sulfato.

No último capítulo desta tese é apresentada a purificação e caracterização de uma nova redutase do sulfito assimilativa, isolada de *Dsm. baculatus* da qual, tal como a bactéria *D. vulgaris*, já tinha sido purificado uma redutase dissimilativa.

1.5.4. Os citocromos

As bactérias redutoras de sulfato possuem citocromos do tipo *b*, *c* e *d*. Os citocromos *b* estão presentes em várias espécies de *Desulfovibrio*, predominando, no entanto, no género *Desulfotomaculum*.¹¹ A sua quantidade relativa varia de espécie para espécie, estando localizados na membrana. A presença de citocromo *b* nestes organismos parece estar mais relacionada com a respiração do fumarato do que com a redução do sulfato, apesar de não existirem evidências que apoiem esta hipótese.

Vários tipos de citocromos *c*, quer mono- quer multi-hémicos, estão associados à redução dissimilativa do sulfato. Estes citocromos estão localizados em diferentes compartimentos celulares. Por exemplo, os citocromos *c*₃ e *c*₅₅₃ localizam-se no periplasma e o citocromo *c* hexa-hémico (redutase do nitrito) encontra-se na membrana citoplasmática. Para além dos citocromos periplasmáticos e membranares, na fracção citoplasmática dos extractos celulares das bactérias redutoras de sulfato é detectada a presença de citocromos *c*, cuja estrutura e função não são conhecidas (citocromo *cc*₃).

O citocromo *c*₃ foi o primeiro citocromo isolado destes organismos anaeróbicos. Possui quatro grupos hémicos e está presente em todas as espécies do género *Desulfovibrio*, constituindo uma característica específica deste género.^{3,31} Os citocromo *c*₃ podem assumir uma dupla funcionalidade, assumindo-se como co-factores das hidrogenases na redução de proteínas de transferência electrónica com baixa massa molecular, tais como a ferredoxina, a flavodoxina ou a rubredoxina, ou funcionar como redutase do enxofre.^{70,71,72,73} A ocorrência destas interações a nível fisiológico tem sido questionada, devido à distribuição celular das proteínas intervenientes. Enquanto que o citocromo *c*₃ é periplasmático, a ferredoxina, a rubredoxina e a flavodoxina são proteínas produzidas no citoplasma.

Os quatro hemos do citocromo c_3 encontram-se covalentemente ligados à cadeia polipeptídica (~13 kDa) através de ligações tioésteres, mediadas por resíduos de cisteína; dependendo do organismo, o motivo de ligação tem a seguinte sequência: Cis- X_2 -His para os organismos eucarióticos, ou Cis- X_4 -His para os restantes. Os átomos de ferro dos diferentes grupos hémicos têm uma coordenação histidina-histidina e, com base em dados de RMN, RPE e cristalografia de Raios-X sabe-se que estão inseridos em ambientes distintos. Cada hemo apresenta um potencial de oxidação-redução diferente aos dos restantes variando entre -130 e -400 mV.⁴¹

Os citocromos mono-hémicos (citocromo c_{553} e citocromo $c_{553(550)}$) estão presentes em todas as bactérias redutoras de sulfato pertencentes ao género *Desulfovibrio*. Apresentam uma coordenação ao ferro do grupo hémico tipo histidina-metionina. Os citocromo c mono-hémicos isolados dos diferentes organismos possuem características semelhantes, constituindo uma grande família. No entanto, a sua função não é conhecida. O citocromo c_{553} é uma proteína de baixa molecular (~9 kDa) com um potencial de oxidação-redução invulgarmente baixo para este tipo de citocromos c , aproximadamente igual a 0 mV. Este citocromo auto-oxidável foi isolado de *D. vulgaris* Hildenborough e Miyazaki, *D. desulfuricans* Berre-Eau e Berre-Sol.^{31,41} O citocromo $c_{553(550)}$ é outro citocromo mono-hémico e foi encontrado em *Desulfomicrobium* (anteriormente classificado como *Desulfovibrio*) *baculatus* Norway 4 e DSM 1743. Apesar de estar relacionado com o citocromo c_{553} , as suas sequências de ácidos aminados da região N-terminal apresentam pouca homologia.

Para além do citocromo c hexa-hémico outros dois citocromos multi-hémicos foram purificados da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774. O citocromo c dimérico (2 x 26.3 kDa) denominado "Split-Soret" que possui dois hemos por cada subunidade. Sabe-se que aos dois hemos estão associados potenciais de oxidação-redução distintos com valores iguais a -168 e -330 mV, respectivamente.⁷⁴ O citocromo c dodeca-hémico, designado geralmente por citocromo cc_3 , é um monómero com massa molecular igual a 40.8 kDa. Os ligandos axiais destes dois últimos citocromos não foram ainda identificados.

Dois citocromos *c* multi-hémicos foram ainda purificados de algumas espécies do género *Desulfovibrio*. Neste grupo inclui-se o citocromo hexadeca-hémico de massa molecular elevada (65.5 kDa) que contém dezasseis hemos com ligação histidina-histidina. Foi purificado de *D. vulgaris* Hildenborough e pensa-se que esteja inserido num complexo proteico associado à parte interna membrana. Devido à sua posição neste complexo foi proposto como um mediador electrónico entre as hidrogenases e a redução dissimilativa do sulfato.⁷⁵ No entanto, tendo em conta o seu elevado conteúdo em hemos, alguns autores sugerem um não envolvimento na transferência electrónica, podendo funcionar como uma oxidoreductase para alguns substratos. O citocromo *c*₃ octa-hémico é uma proteína citoplasmática (25 kDa) encontrada em muitas espécies do género *Desulfovibrio*.⁷⁶ A função destes dois citocromos multi-hémicos não está estabelecida.

Do exposto, pode concluir-se que as bactérias redutoras de sulfato contêm uma grande variedade de citocromos *c*, quer mono-, quer multi-hémicos. Por exemplo no género *Desulfovibrio* foram identificados um citocromo *c* mono-hémico e, no mínimo três tipos de citocromos *c* multi-hémicos, que apresentam características distintas.

1.5.5. As hidrogenases

Apesar de catalisarem um processo de oxidação-redução simples, as hidrogenases apresentam uma grande diversidade em termos da constituição dos centros activos. São proteínas de ferro-enxofre que contêm, geralmente, 4 a 12 átomos de ferro não-hémico, disposto em agregados de ferro-enxofre. Em bactérias redutoras de sulfato e dependendo do conteúdo em metais distinguem-se três tipos de hidrogenases: *i*) as hidrogenases de ferro (hidrogenase de [Fe]) que apenas contêm ferro organizado em agregados de ferro-enxofre; *ii*) as hidrogenases de [NiFe] que possuem um centro mononuclear de níquel e agregados de ferro-enxofre e *iii*) as hidrogenases de [NiFeSe] que contêm níquel, agregados de ferro-enxofre e selénio. Um organismo poderá produzir uma só ou possuir simultaneamente as diferentes hidrogenase.⁷⁷

As hidrogenases de [Fe] são constituídas por duas subunidades com massas moleculares de 46 kDa (α) e 10 kDa (β). A subunidade maior contém dois agregados [4Fe-4S] típicos e um terceiro agregado de ferro- enxofre com características não usuais cuja estrutura não é conhecida, denominado agregado H. Pensa-se que este agregado constitui o sítio de activação do hidrogénio.⁶⁵ Contrariamente às restantes hidrogenases, este grupo representa uma pequena família de proteínas. Normalmente, a hidrogenase de [Fe] é produzida no periplasma de algumas bactérias redutoras de sulfato, tais como *D. vulgaris* Hidenborough e *D. desulfuricans* ATCC 7757.^{65,78,79} De entre todos os tipos, a hidrogenase de [Fe] exhibe a mais elevada actividade de produção e consumo de H₂.

As hidrogenases de [NiFe] estão presentes na maioria dos microrganismos, nomeadamente nas bactérias fotossintéticas, nos organismos oxidantes de hidrogénio e nas bactérias metanogénicas.⁴¹ Este tipo de hidrogenases ocorre no periplasma de todas as espécies do género *Desulfovibrio* identificadas até à data. Em geral, as hidrogenases de [NiFe] são estruturalmente semelhantes, sendo compostas por duas subunidades com massa molecular aproximadamente igual a 60 e 30 kDa, respectivamente. Contêm dois agregados [4Fe-4S], um agregado [3Fe-4S] e um centro mononuclear de níquel, que está envolvido no processo de activação do hidrogénio.⁸⁰

As hidrogenase de [NiFeSe] contêm dois agregados [4Fe-4S], um átomo de níquel e um átomo de selénio. Contrariamente às restantes classes de hidrogenases, não possuem qualquer agregado do tipo [3Fe-4S]. Foram isoladas da fracção citoplasmática de algumas espécies de *Desulfovibrio* e de organismos metanogénicos.⁸¹ Apesar de, em termos estruturais, apresentarem homologias com as hidrogenases de [NiFe], são distintas deste último grupo no que diz respeito à composição do sítio activo e comportamento catalítico. As propriedades catalíticas observadas neste tipo de hidrogenases sugerem que o selénio impõe uma modificação da reactividade química do níquel (o sítio activo). Foi também demonstrado que o selénio, na forma de selenocisteína, é um ligando natural do átomo de níquel.⁸²

Em bactérias que contêm dois ou mais tipos de hidrogenases, têm sido apresentadas evidências experimentais que indicam que as hidrogenases estão especificamente associadas às redutases do APS e do sulfito.² Por exemplo em *D. vulgaris*, a hidrogenase de [Fe] periplasmática produz electrões que são usados na redução do APS, enquanto que a hidrogenase membranaar do tipo [NiFe] fornece os seis electrões necessários para a conversão de sulfito em sulfureto. Resumindo, as hidrogenases e a consequente produção de H₂ são essenciais para a redução dissimilativa do sulfato que ocorre nas bactérias redutoras de sulfato.

1.5.6. Proteínas de transporte electrónico

As bactérias do género *Desulfovibrio* contêm várias proteínas de transporte electrónico, sendo as mais comuns a ferredoxina, a flavodoxina e a rubredoxina.⁴¹

A ferredoxina (Fd) está presente na maioria das espécies de *Desulfovibrio*, ocorrendo no citoplasma. Em algumas espécies podem co-existir diferentes formas de ferredoxinas, podendo possuir um ou dois agregados do tipo [4Fe-4S] ou ainda um agregado [3Fe-4S]. Em *D. gigas* são produzidas duas formas de ferredoxinas: a ferredoxina I que possui um agregado [4Fe-4S] e a ferredoxina II que contém um agregado [3Fe-4S]. Estas duas proteínas diferem na sua reactividade fisiológica. Enquanto que a Fd I está associada à reacção fosforoclástica, a Fd II estimula a oxidação de hidrogénio na presença de sulfito, através do citocromo c₃.⁸³

A flavodoxina é uma proteína de baixa massa molecular (~ 15 kDa) que contém unidades FMN como grupo prostético. Em certas espécies a flavodoxina é sintetizada em condições deficientes em ferro. Em *D. vulgaris* Hildenborough, é aparentemente constitutiva e produzida no citoplasma.⁸⁴

A rubredoxina é uma proteína de ferro-enxofre que possui um centro mononuclear do tipo FeCis₄. São encontradas em muitas espécies de bactérias anaeróbicas, estando presentes em todas as espécies de *Desulfovibrio*.³¹ A sua função é desconhecida.

Para além das proteínas descritas anteriormente, outras são produzidas por algumas espécies de bactérias redutoras de sulfato. Entre estas englobam-se a desulforredoxina, a rubreritrina, a desulfoferrodoxina e uma proteína de ferro-enxofre com um agregado que contém seis átomos de ferro.^{41,85,86,87} Das bactérias *D. gigas* e *D. desulfuricans* ATCC 2774, foi purificada e caracterizada uma oxidoreductase do aldeído que, *in vitro*, medeia a produção de hidrogénio molecular através de uma cadeia de transferência electrónica que envolve a flavodoxina, o citocromo c_3 e a hidrogenase. É uma proteína de ferro-enxofre (200 kDa) que contém dois agregados [2Fe-2S] e um centro de molibdénio (sob a forma de molibdopterina).^{88,89} Estas proteínas poderão estar envolvidas na redução dissimilativa do sulfato, mas a sua função não é conhecida.

1.6. As bactérias redutoras de sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo taxonomica e filogeneticamente variado que tem um papel chave nos ecossistemas anaeróbicos. Embora a maioria esteja associada à redução dissimilativa do sulfato, muitas espécies podem crescer na ausência de compostos de enxofre orgânico, por um processo fermentativo.⁴¹ São normalmente isoladas de sedimentos de águas doces ou salgadas, águas estagnadas, solos, sedimentos ou do interior de intestinos.¹¹ São normalmente considerados como organismos anaeróbicos obrigatórios. No entanto, foi recentemente observada a ocorrência destes microrganismos em camadas oxigenadas de lamas.⁹⁰ Foi também demonstrado que as BRS são capazes de sobreviver durante longos períodos de tempo na presença de oxigénio.^{91,92}

Do ponto de vista bioquímico, as BRS têm a capacidade de utilizar o sulfato como aceitador final de electrões, reduzindo-o a sulfureto. Os electrões usados neste processo podem ter origem no hidrogénio, ou compostos orgânicos de baixa massa molecular, tais como o lactato ou o acetato, que servem de fontes de carbono. Algumas espécies são versáteis em relação às necessidades nutricionais, podendo crescer na presença de ácidos gordos de elevada massa molecular ou compostos aromáticos simples, como por exemplo o benzeno ou o fenol.^{3,11}

I.6.1. Posição taxonómica das BRS

Com o desenvolvimento das técnicas de sequenciação das proteínas e dos ácidos nucleicos tem sido possível o estudo filogenético e evolutivo das BRS.^{90,93,94} Presentemente, pensa-se que estes organismos se encontrem distribuídos em dois domínios: *Arquea* e *Bacteria*.⁹⁵

No domínio *Arquea*, as BRS são representadas pelos organismos do género *Archaeoglobus*. Para além destas bactérias, todas as restantes BRS são eubactérias pertencentes ao domínio *Bacteria*. As bactérias de *Archaeoglobus* foram isolados de fontes hidrotérmicas nas proximidades de vulcões e são caracterizadas por temperaturas de crescimento óptimo entre 65 e 110 °C.³⁰ Para além da molécula de sulfato, as bactérias deste género podem utilizar sulfito ou tiosulfato como aceitadores de electrões.⁹⁶ Embora possam reduzir enxofre, o seu crescimento não se efectua na presença deste aceitador.

Inicialmente o género *Archaeoglobus* foi incluído numa linha filogenética que separava as arqueobactérias termofílicas redutoras de enxofre, pertencentes ao reino *Crenarchaeota*, e as arqueobactérias metanogénicas e halófilas (*Euryarchaeota*). Tendo em conta a posição filogenética do género *Archaeoglobus*, o seu metabolismo e a presença de vários co-factores associados aos organismos metanogénicos, foi sugerido que este género representaria uma forma de transição entre as duas linhas de arqueobactérias anteriormente referidas.^{30,97} Contudo, em 1990 Woese propôs a inclusão deste género no reino *Euryarchaeota*, que engloba ainda as bactérias metanogénicas.⁹⁵

O isolamento e a descrição dos organismos pertencentes ao género *Archaeoglobus* demonstrou que a redução dissimilativa do sulfato não está limitada aos organismos do domínio *Bacteria*. A ocorrência deste processo em duas linhas evolutivas primárias sugere que esta via metabólica já ocorreria em estados primários da evolução bioquímica.³⁰

No domínio *Bacteria*, as BRS dividem-se em dois grupos distintos: as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas mesofílicas. O primeiro grupo é representado pelos organismos pertencentes ao género *Desulfotomaculum* (*Dtm.*).⁹⁸ São bactérias esporulentas que apresentam uma grande diversificação entre as diferentes espécies.²⁹

De entre as bactérias do género *Desulfotomaculum*, destacam-se as espécies *Dtm. acetoxidans*, *Dtm. nigrificans*, *Dtm. orientis* e *Dtm. ruminis*. A comparação das sequências dos seus 16S rRNA revela que entre as duas primeiras espécies existe apenas 86% de homologia, o que reflecte as diferenças fisiológicas entre as espécies. De facto, *Dtm. acetoxidans* é uma bactéria mesofílica, cujo teor em G+C é igual a 37% e que oxida o etanol a acetato. Contrariamente, a espécie *Dtm. nigrificans* é um organismo moderadamente termofílico, com um conteúdo em G+C de 45%, que oxida o lactato a etanol.^{3,11} Por outro lado, a comparação das sequências 16S rRNA das bactérias *Dtm. orientis* e *Dtm. ruminis* evidencia uma maior diversificação das bactérias do género *Desulfotomaculum*. As duas sequências têm apenas 83% de similaridade.¹¹

O segundo grupo das BRS do domínio *Bacteria* é constituído pelas bactérias Gram-negativas mesofílicas e, do ponto de vista filogenético representa um grupo com características restrictas, quando comparado com outros grupos de bactérias.

Com base na comparação das sequências dos 16S rRNA, as BRS Gram-negativas mesofílicas estão restringidas à divisão δ das bactérias púrpuras (*Proteobacteria*) ao lado das bactérias redutoras de enxofre, das mixobactérias e dos bdellovibrios.^{29,94}

Apesar das BRS pertencentes à divisão δ já se encontrarem classificadas com base em critérios nutricionais e bioquímicos, foi recentemente proposta uma reclassificação taxonómica deste grupo.^{29,99} Assim, existiria a família das *Desulfovibrionaceae* que incluiria a maioria das espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*, enquanto que os restantes géneros, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter* e *Desulfosarcina*, estariam reunidos na família *Desulfobacteriaceae*. Esta classificação não engloba, no entanto, os géneros *Desulfomena*, *Thermodesulfobacterium* e *Desulfuromonas*, o que demonstra que a classificação das BRS ainda não está completa.

De entre as BRS Gram-negativas o género melhor caracterizado é o género *Desulfovibrio* que contém o maior número de espécies conhecidas. Dentro da família da *Desulfovibrionaceae* distinguem-se, no mínimo, cinco linhas evolutivas, traduzindo a diversidade filogenética das espécies.⁹⁹

I.6.2. O impacto ambiental e económico das BRS

Devido à anaerobicidade das bactérias redutoras de sulfato e às restrições termodinâmicas do seu metabolismo, estas bactérias existem, normalmente, na natureza como componentes de comunidades ou consórcios de organismos. Estes consórcios tomam a forma de biofilmes, permitindo a formação de micro-ambientes anaeróbicos dentro de ecossistemas aeróbicos. A formação de micro-ambientes anaeróbicos pode ocorrer nos solos, em biofilmes ou em pequenas partículas, onde o crescimento de microrganismos aeróbicos e a produção de sulfureto originam as condições necessárias para o desenvolvimento do ciclo do enxofre, mediando a energia requerida pelas BRS, bem como pelos organismos que oxidam sulfureto. Deste modo, estes organismos conseguem sobreviver em quase todos os ambientes do planeta terrestre. Na realidade, observou-se que as BRS podem constituir o penúltimo estado no processo de mineralização da matéria orgânica, ao lado dos organismos metanogénicos que são responsáveis pelo estado final. O metano produzido difunde das zonas anaeróbicas para ser posteriormente sujeito à mineralização aeróbica pelas bactérias metanotróficas.¹⁰⁰ A actividade destes consórcios origina o consumo de oxigénio nas zonas oxigenadas e a produção de vários compostos parcialmente oxidados resultantes da fermentação. A deficiência em oxigénio tem como consequência a predominância de organismos anaeróbicos obrigatórios. Na presença de sulfato os consórcios são dominados pelas bactérias redutoras de sulfato que, devido à elevada produção de sulfuretos, contribuem para o aumento da anaerobicidade baixando o potencial de oxidação-redução do sistema.¹⁰¹

Para além dos ambientes poluídos, as BRS podem ocorrer em ambientes não poluídos tais como nos pântanos, nos quais mais do que metade da decomposição total é devida à redução da molécula de sulfato. As BRS intervêm nos passos finais da mobilização de carbono. Assim, o carbono fixado pelas plantas superiores produz biomassa, que é depois degradada por uma série de organismos eucarióticos, podendo ser convertida em dióxido de carbono e água pelos microrganismos aeróbicos. No entanto, uma parte significativa desta matéria é oxidada até ao nível de ácidos orgânicos e alcoóis pelos organismos heterotróficos,

podendo ser metabolizados pelas BRS com produção de acetato, dióxido de carbono e sulfureto. Em algumas espécies, o acetato pode ser usado pelas bactérias metanogénicas que produzem metano e dióxido de carbono.¹⁰¹

As consequências ambientais devidas ao crescimento das BRS podem ser devastadoras. Para além do intenso odor associado à produção de sulfureto, são responsáveis pela morte de peixes, pela destruição de culturas, bem como pela deterioração das infra-estruturas nas indústrias de petróleo, gases e óleos.

Na indústria de petróleo, as BRS são responsáveis pela corrosão da maquinaria, tubagens e tanques de armazenamento, onde as perdas ascendem a vários biliões de escudos por ano. A acção metabólica das BRS tem fortes implicações económicas na manutenção das condutas e tanques de armazenamento subterrâneo de gases.¹⁰² O metabolismo destes organismos tem sido associado à presença de metais nos ecossistemas, principalmente devido à produção de sulfureto, que forma precipitados com os metais, tornando-os disponíveis para outros organismos.¹⁰³ A dissolução de metais, nomeadamente ferro, das superfícies metálicas causa a corrosão e deterioração das estruturas. A corrosão anaeróbica do ferro associada às BRS tem características únicas. Está restrita a ambientes anaeróbicos e envolve um processo electroquímico.¹⁰⁰ A presença física de células microbianas na superfície de um metal, bem como as suas actividades metabólicas originam imperfeições físicas na superfície metálica e a acumulação de nutrientes, resultando na formação de gradientes de oxigenação e consequentemente, diferentes potenciais de oxidação-redução. O papel das BRS na corrosão microbiológica está associada ao estabelecimento de uma célula electrolítica, estimulando a formação de áreas anódicas correspondentes às zonas deficientes em oxigénio (de baixo potencial) e catódicas resultante da oxidação metabólica de hidrogénio pelas BRS.¹⁰⁰

As BRS desempenham, ainda, importantes papéis em outras áreas económicas. Devido à produção de sulfureto, causam a precipitação de ferro, conduzindo ao escurecimento e descoloração de vários produtos, como o papel ou até produtos alimentares.¹⁰²

1.7. Bibliografia

1. Raulin, F., e Toupance, G. 1977. *J. Mol. Evol.* 9, 329-338.
2. Peck, H.D., Jr., e Lissolo, T. 1988. In "The nitrogen and sulfur cycles", Ed. J.A. Cole e S. J. Ferguson, págs. 99-132, Cambridge University Press.
3. Postgate, J.R. 1984. In "The sulphate reducing bacteria", 2nd Ed., págs. 1-9, Cambridge University Press.
4. Peck, H.D., Jr., e Bramlett, R.N. 1982. In "Flavins and flavoproteins", Ed. V. Massey, e C.H., Williams, págs. 851-858.
5. Fraústo da Silva, J.J.R., e Williams, R.J.P. 1991. In "The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life", págs. 453-462, Clarendon Press, Oxford.
6. Robertson, L.A., e Kuenen, J.G. 1991. In "The prokaryotes", Cap. 16, págs. 385-413.
7. Roy, A.B., e Trudinger, P.A. 1970. In "The biochemistry of inorganic compounds of sulfur", págs. 207-250, Cambridge University Press.
8. Kelly, D.P. 1988. In "Nitrogen and sulphur cycles", Ed. J.A. Cole e S. J. Ferguson, págs. 65-98, Cambridge University Press.
9. Smith, A.J. 1966. *J. Gen. Microbiol.* 42, 371-380.
10. Yoch, D.C., e Lindstrom, E.S. 1971. *J. Bacteriol.* 106, 700-701.
11. Widdel, F. 1988. In "Biology of anaerobic microorganisms", Ed. A.J.B. Zehnder, págs. 469-585.
12. Lu, W.-P. 1986. *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 313-317.
13. Lu, W.-P., e Kelly, D.P. 1983. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1661-1671.
14. Beffa, T., Berczy, M., e Aragno, M. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* 90, 123-128.
15. Lyric, R.M., e Suzuki, I. 1970. *Can. J. Biochem.* 48, 344-354.
16. Kelly, D.P. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 298, 499-528.

17. Lampreia, J., Moura, I., Xavier, A.V., LeGall, J. Peck, H.D., Jr., e Moura, J.J.G. 1992. In "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes", Ed. F. Müller, Vol. III págs. 333-355.
18. Rassel, M., Odel, P., e Holmgren, A. 1990. *J. Bacteriol.* **172**, 1923.
19. Abrams, W.R., e Schiff, J.A. 1973. *Arch. Mikrobiol.* **94**, 1-10.
20. Kang, L. 1986. Tese de Doutorado, Universidade da Georgia, USA.
21. Huynh, B.H., Kang, L., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 15373-15376.
22. Saidha, T., Na, S.-Q, Li, J., e Schiff, J.A. 1988. *Biochem. J.* **253**, 533.
23. Schmidt, A. 1977. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 137-140.
24. Trüper, H.G., e Fischer, V. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **298**, 99-112.
25. Schmidt, A. 1977. *Arch. Microbiol.* **112**, 263.
26. Tsang, M.L.-S., e Schiff, J.A. 1978. *Plant Sci. Lett.* **11**, 177-183.
27. Schmidt, A. 1973. *Arch. Microbiol.* **93**, 29-52.
28. Nakamura, T., Iwahashi, H., e Eguchi, Y. 1984. *J. Bacteriol.* **158**, 1122-1127.
29. Devereux, R., Delaney, M. Widdel, F., e Stahl, D.A. 1989. *J. Bacteriol.* **171**, 6689-6695.
30. Stetter, K.O., Lauerer, G Thomm, M. e Neuner, A. 1987. *Science* **236**, 822-824.
31. LeGall, J., e Fauque, G. 1988. In "Biology of anaerobic microorganisms", Ed. A.J.B. Zehnder, págs 587-639, John Wiley, New York.
32. Akagi, J.M., e Campbell, L.L. 1962. *J. Bacteriol.* **84**, 1194-1201.
33. Liu, C.L., Hart, N., e Peck, H.D., Jr. 1982. *Science* **217**, 363-364.
34. Bramlett, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**, 2979-2986.
35. Chambers, L.A., e Trudinger, P.A. 1975. *J. Bacteriol.* **123**, 36-40.
36. Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **298**, 443-466.

37. Drake, H.L., e Akagi, J.M. 1978. *J. Bacteriol.* 136, 916-923.
38. Suh, B. e Akagi, J.M. 1969. *J. Bacteriol.* 99, 210-215.
39. Findley, J.E., e Akagi, J.M. 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 266-271.
40. Odom, J.M. 1993. In "The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives", Ed. J.M. Odom e R. Singleton Jr., págs. 1-20, Springer-Verlag.
41. Fauque, G., LeGall, J., e Barton, L.L. 1991. In "Variations in autotrophic life", Ed. J.M. Shively e L.L. Barton, págs 271-337, Academic Press, New York.
42. Fitz, R.M., e Cypionka, H. 1989. *Arch. Microbiol.* 152, 369-376.
43. Peck, H.D., Jr. 1960. *J. Biol. Chem.* 235, 2734-2738.
44. Peck, H.D., Jr. 1966. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 112-118.
45. Thaeur, R.K., Jungerman, K., e Decker, K. 1977. *Bacteriol. Rev.* 41, 100-180.
46. Steekamp, D.J., e Peck, H.D., Jr. 1981. *J. Biol. Chem.* 256, 5450-5458.
47. Biebl, H., e Pfennig, N. 1977. *Arch. Microbiol.* 112, 115-117.
48. Pfennig, N., e Biebl, H. 1976. *Arch. Microbiol.* 110, 3-12.
49. Whitman, W.B. 1985. In "The bacteria", Ed. C.R. Woese e R.S. Wolfe, Vol. III págs. 3-84, Academic Press.
50. Jarrel, K.F., e Kalmokoff, M.L. 1988. *Can. J. Microbiol.* 34, 557-576.
51. Daniels, L., Belay, N., e Rajagopal, B.S. 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 703-709.
52. Peck, H.D., Jr. 1993. In "The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives", Ed. J.M. Odom e R. Singleton, Jr., págs. 41-75, Springer-Verlag.
53. Guarraia, L.J., e Peck, H.D., Jr. 1971. *J. Bacteriol.* 106, 890-895.
54. Akagi, J.M., e Campbell, L.L. 1963. *J. Bacteriol.* 86, 563-568.
55. Ware, D.A., e Postgate, J.R. 1971. *J. Gen. Microbiol.* 67, 145-160.
56. Bowen, T.J., Happold, F.C., e Taylor, B.F. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 566-576.

57. Dahl, C., Koch, H.-G., Keuken, O., e Trüper, H.G. 1990. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 27-32.
58. Liu, C.L., DerVartanian, D.V., e Peck, H.D., Jr. 1979. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 962-970.
59. Moura, I., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr., Fauque, G., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1075-1082.
60. Arendsen, A.F., Verhagen, M.F.J.M., Wolbert, R.B.G., Pierik, A.J., Stams, A.J.M., Jetten, M.S.M., e Hagen, W.R. 1993. *Biochem.* 32, 10323-10330.
61. Lee, J.P., e Peck, H.D., Jr. 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 583-589.
62. Lee, J.P., Yi, C.S., LeGall, J., e Peck, H.D., Jr. 1973. *J. Bacteriol.* 115, 529-542.
63. Trudinger, P.A. 1970. *J. Bacteriol.* 104, 158-170.
64. Hatchikian, E.C. 1983. *J. Bacteriol.* 153, 1211-1220.
65. Huynh, B.H. 1994. *Methods in Enzymology* 243, em impressão.
66. Lee, J.P., Yi, C.S., LeGall, J., e Peck, H.D., Jr. 1973. *J. Bacteriol.* 115, 453-455.
67. Moura, I., Lino, A.R., Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Fauque, G., Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 1032-1041.
68. Moura, J.J.G., Moura, I., Santos, H., Xavier, A.V., Scandellari, M., e LeGall, J. 1982. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1002-1009.
69. Moura, I., e Lino, A.R. 1994. *Methods in Enzymology* 243, em impressão.
70. Odom, J.M., e Peck, H.D., Jr. 1984. *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 551-592.
71. Stewart, D.E., LeGall, J., Moura, I., Moura, J.J.G., Peck, H.D., Jr., Xavier, A.V., Weiner, P.K., e Wampler, J.E. 1987. *Biochem.* 27, 2444-2450.
72. Stewart, D.E., LeGall, J., Moura, I., Moura, J.J.G., Peck, H.D., Jr., Xavier, A.V., Weiner, P.K., e Wampler, J.E. 1989. *Eur. J. Biochem.* 185, 695-700.

73. Palma, P.N., Moura, I., LeGall, J., Beeumen, J.V., Wampler, J.E., e Moura, J.J.G. 1994. *Biochem.* 33, 6394-6407.
74. Liu, C.L., Costa, C., Coutinho, I.B., Moura, J.J.G., Moura, I., Xavier, A.V., e LeGall, J. 1988. *J. Bacteriol.* 170, 5545-5551.
75. Voordouw, G., Fu, R., e Keon, R. 1994. Livro de Resumos do *Fourth International Conference on the Molecular Biology of Hydrogenases*.
76. Higuchi, Y., Inaka, K., Yasuoka, N., e Yagi, T. 1987. *Biochim. Biophys. Acta* 911, 341-348.
77. Fauque, G., Peck, H.D., Jr., Moura, J.J.G., Huynh, B.H., Berlier, Y., DerVartanian, D.V., Teixeira, M., Przybyla, A.E., Lespinat, P.A., Moura, I., e LeGall, J. 1988. *FEMS Microbiol. Rev.* 54, 299-344.
78. Pierik, A.J., Hagen, W.R., Redeker, J.S., Wolbert, R.B.G., Boersma, M., Verhagen, M.F.J.M., Grande, H.J., Veeger, C., Mutsaers, P.H.A., Sands, R.H., e Dunham, W.R. 1992. *Eur. J. Biochem.* 209, 63-72.
79. Hatchikian, E.C., Forget, N., Fernandez, V.M., Williams, R., e Cammack, R. 1992. *Eur. J. Biochem.* 209, 357-365.
80. Moura, J.J.G., Teixeira, M., e Moura, I. 1988. *Pure Applied Chemistry* 61, 915-921.
81. Teixeira, M., Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P.A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H.D., Jr., Xavier, A.V., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1987. *Eur. J. Biochem.* 167, 47-58.
82. Eidsness, M.K., Scott, R.A., Prickril, B.C., DerVartanian, D.V., LeGall, J., Moura, I., Moura, J.J.G., e Peck, H.D., Jr. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 147-151.
83. Moura, J.J.G., Macedo, A.L., e Palma, P.N. 1994. *Methods in Enzymology*, em impressão.
84. Meyer, O., e Cusanovich, M.A. 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 1-28.

85. Moura, I., Bruschi, M., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 1037-1044.
86. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.-Y., e LeGall, J. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 21596-21602.
87. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.-Y., e LeGall, J. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 4489-4496.
88. Barata, B.A.S., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1993. *Biochem.* **32**, 11559-11568.
89. Duarte, R.O., Barata, B.A.S., LeGall, J., Moura, I., e Moura, J.J.G. 1993. Livro de Resumos do 3º Congresso Nacional de Bioquímica, Sociedade Portuguesa de Bioquímica, pág. 124.
90. Canfield, D.E., e DeMarias, D.J. 1991. *Science* **251**, 1471-1473.
91. Cypionka, H., Widdel, F., e Pfennig, N. 1985. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 39-45.
92. Wall, J.D., Rapp-Gilles, B.J., Brown, M.F., e White, J.A. 1990. *Can. J. Microbiol.* **36**, 400-408.
93. Devereux, R., Kane, M.D., Winfrey, J., e Stahl, D.A. 1992. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 601-609.
94. Woese, C.R. 1987. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
95. Woese, C.R., Kander, O., e Wheelis, M.L. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
96. Burggraf, S., Jannach, H.W., Nicolaus, B., e Stetter, K.O. 1990. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 24-28.
97. Achenbach-Richter, L., Stetter, K.O., e Woese, C.R. 1987. *Nature* **327**, 348-349.
98. Campbell, L.L., e Postgate, J.R. 1965. *Bacteriol. Rev.* **29**, 359-363.
99. Devereux, R., He, S.-H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeGall, J., e Whitman, W.B. 1990. *J. Bacteriol.* **172**, 3609-3619.

100. Hamilton, W.A. 1985. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 195-217.
101. Singleton, R., Jr. 1993. *In* "The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives", Ed. J.M. Odom e R. Singleton, Jr., págs. 1-20, Springer-Verlag.
102. Odom, J.M. 1993. *In* "The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives", Ed. J.M. Odom e R. Singleton, Jr., págs. 189-210, Springer-Verlag.
103. Postgate, J.R. 1984. *In* "The sulphate reducing bacteria", 2nd Ed., págs. 107-116, Cambridge University Press.

CAPÍTULO II

A IMPORTÂNCIA DOS CENTROS FERRO-ENXOFRE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

II. A importância dos centros ferro enxofre em sistemas biológicos.

1. Introdução	43
2. A estequiometria dos centros ferro-enxofre	45
2.1. O centro FeCis_4	45
2.2. O agregado $[\text{2Fe-2S}]$	47
2.3. O agregado $[\text{4Fe-4S}]$	48
2.4. O agregado $[\text{3Fe-4S}]$	49
2.5. Interconversão entre os agregados $[\text{3Fe-4S}]$ e $[\text{4Fe-4S}]$	50
2.6. Agregados com outras estequiometrias	51
3. Propriedades magnéticas e de oxidação-redução dos centros ferro-enxofre	55
3.1. O centro FeCis_4	56
3.2. O agregado $[\text{2Fe-2S}]$	57
3.3. O agregado $[\text{4Fe-4S}]$	58
3.4. O agregado $[\text{3Fe-4S}]$	60
4. O papel não-redox dos agregados $[\text{4Fe-4S}]$	62
4.1. O bifuncionalismo da aconitase	62
4.1.1. O papel enzimático da aconitase	62
4.1.2. O papel regulatório da aconitase	70
4.2. A endonuclease III	73
4.3. A amidotransferase da glutamina 5-fosforibosil-1-pirofosfato	76
4.4. Outras proteínas que contêm agregados $[\text{4Fe-4S}]$ com função não-redox	77
5. Alguns aspectos evolutivos dos centros ferro-enxofre	78
6. Bibliografia	87

II.1. Introdução

O ferro é um dos metais de transição da tabela periódica mais abundante no planeta terrestre, não sendo por isso, surpreendente a sua vasta incorporação em muitos sistemas biológicos. Distinguem-se dois grandes grupos de proteínas que contêm ferro: as proteínas de ferro hémico e as proteínas de ferro não-hémico. Ao primeiro grupo pertencem todas as proteínas que possuem ferro coordenado por um anel tetrapirrólico polidentado, tal como as porfirinas. Ao segundo grupo, pertencem todas as proteínas que não estão englobadas no primeiro, isto é, aquelas que possuem ferro coordenado a ligandos não pirrólicos. A coordenação ao átomo de ferro pode assumir diferentes estruturas, desde a tetraédrica à octaédrica, podendo ser constituída por ácidos aminados da cadeia polipeptídica da proteína, por moléculas de solvente, substratos, ou até inibidores da actividade enzimática no caso de proteínas com função enzimática.

Durante muito tempo o grupo das proteínas não-hémicas foi constituído por proteínas de baixa massa molecular que mediavam a transferência electrónica entre enzimas envolvidas em diversas vias metabólicas. Ao longo da última década foi evidenciado o papel dos centros ferro-enxofre como sítio activo de enzimas não envolvidas em reacções de oxidação-redução. Hoje, é bem conhecida a participação destas proteínas em reacções variadas nomeadamente, transferência electrónica, oxidação-redução de substratos, transferência de grupos não-redox, inserção de oxigénio e regulação da actividade enzimática. Sabe-se também que têm um papel relevante em processos biológicos muito importantes para a célula, como o ciclo de Krebs, a fotossíntese, a cadeia respiratória ou a síntese e reparação de DNA.

O mais importante subgrupo da família das proteínas de ferro não-hémico é constituído pelas proteínas de ferro-enxofre. O termo "proteínas de ferro-enxofre" refere-se a proteínas que possuem centros, ou agregados, em que átomos de ferro se encontram coordenados por enxofre inorgânico e/ou enxofre pertencente a resíduos de cisteína. Devido ao seu grande número, foram consideradas como uma classe distinta nos anos 60. A

sua caracterização bioquímica tem sido lenta, apesar de se pensar que o aparecimento dos centros ferro-enzofre na natureza, tenha ocorrido nos primórdios da vida.

Em soluções aquosas e na ausência de oxigénio, uma grande variedade de centros de ferro-enzofre associam-se espontaneamente, a partir de Fe, grupos tiol (RS^-) e S^{2-} . Devido a este facto tem sido sugerido que as proteínas de ferro-enzofre tenham tido origem na incorporação de complexos Fe-S inorgânicos em cadeias polipeptídicas pré-existentes.¹ Dado que eram estas as condições da atmosfera primordial, pensa-se que estes centros representem um dos co-factores biológicos primeiramente produzidos durante a evolução química.

São conhecidas as estruturas básicas de quatro diferentes tipos de centros de ferro-enzofre, variando entre um e quatro átomos de ferro: FeCis_4 , $[\text{2Fe-2S}]$, $[\text{3Fe-4S}]$ e $[\text{4Fe-4S}]$.^{2,3} Para além destas quatro estruturas básicas foi também estabelecida a estrutura da nitrogenase (uma proteína de ferro-enzofre que contém ferro e molibdénio), através da cristalografia de Raios-X.⁴ Recentemente foi descrita a ocorrência em proteínas, de centros com uma estequiometria superior, contendo seis átomos de ferro.^{5,6,7}

Em certos casos, as proteínas (ou enzimas) apenas contêm um destes centros. No entanto, e mais frequentemente, estes centros de ferro-enzofre estão associados a outros grupos prostéticos, tais como grupos hémicos, flavinas, ou alguns metais, dos quais se destacam, o níquel, o selénio, o molibdénio e o vanádio. A ocorrência de associações de centros de ferro-enzofre na mesma proteína é também vulgar.

Actualmente a coordenação ao átomo de ferro parece ser bastante flexível, e portanto mais complexa, podendo ocorrer a substituição de resíduos de cisteína por outros ácidos aminados, nomeadamente aspartato ou histidina (em que a ligação ao átomo de ferro é mediada através dos grupos O ou N) da cadeia polipeptídica.

II.2. A estequiometria dos centros ferro-enxofre

Como anteriormente já referido, a estequiometria dos centros ferro-enxofre identificados em sistemas biológicos é bastante variada.

As diferentes estruturas dos centros ferro-enxofre estabelecidas através de estudos espectroscópicos e posteriormente confirmadas por cristalografia de Raios-X estão representados na Figura II.1.

II.2.1. O centro FeCis_4

O centro FeCis_4 representa a estrutura mais simples dos centros ferro-enxofre descritos até à data. É caracterizado por um único átomo de ferro coordenado por quatro resíduos de cisteína (Figura II.1A). Contrariamente aos outros centros, no centro FeCis_4 não existe ligação a enxofre inorgânico. Foi primeiramente identificado na rubredoxina, uma proteína de baixa massa molecular (~ 6 kDa). Neste caso o centro ferro-enxofre apresenta uma geometria quase tetraédrica. As rubredoxinas podem ser isoladas de várias espécies de bactérias anaeróbicas.^{8,9,10,11} A sua função não é conhecida, embora tenha sido parcialmente purificada de *D. gigas* uma oxidoreductase da rubredoxina dependente de NADH/H^+ com especificidade para a rubredoxina.¹² Foi também possível isolar uma rubredoxina da bactéria aeróbica *Pseudomonas oleovorans*, que contém, em oposição às restantes, dois átomos de ferro por cadeia polipeptídica e medeia a transferência electrónica na reacção de ω -hidroxilação dos ácidos gordos.¹³

Esta estequiometria pode ainda ser encontrada numa outra proteína homodimérica isolada de *D. vulgaris* e *D. desulfuricans*, denominada rubreritrina. Para além do centro FeCis_4 , a rubreritrina possui um outro centro binuclear do tipo hemeritrina por cadeia polipeptídica.^{9,14}

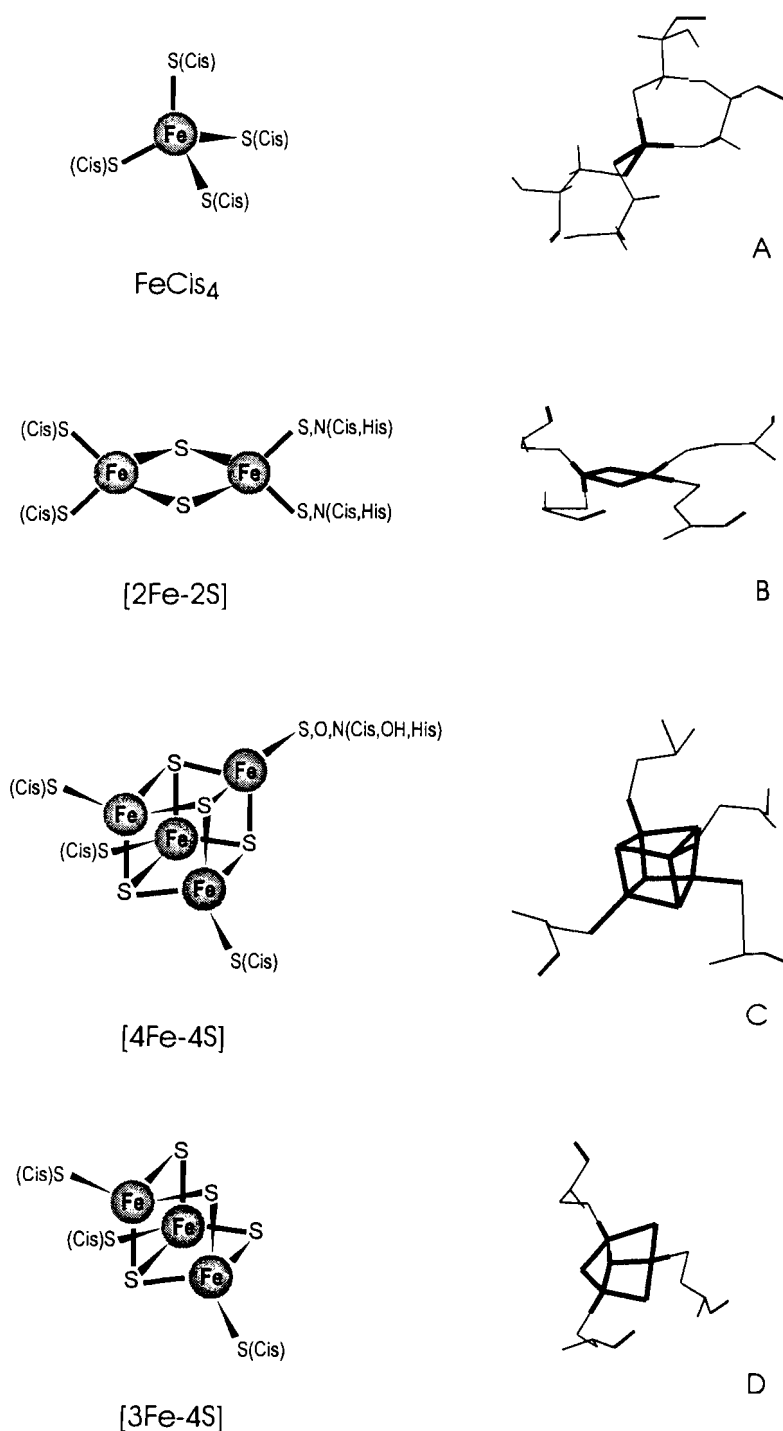


Figura II.1. As estruturas básicas dos centros ferro-enzofre. (A) centro FeCis_4 da rubredoxina de *C. pasteurianum*; (B) agregado $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ da ferredoxina de *S. platensis*; (C) agregado $[\text{4Fe-4S}]$ da ferredoxina de *P. aerogenes*; e (D) agregado $[\text{3Fe-4S}]$ da aconitase de porco.

Uma variante do centro FeCis_4 da rubredoxina, mas com uma geometria tetraédrica distorcida, foi identificado nas proteínas desulforedoxina e desulfoferrodoxina. A desulforedoxina é um homodímero (2×4 kDa) que possui um centro ferro-enxofre por monómero.¹⁵ Por seu lado, a desulfoferrodoxina é uma proteína recentemente descoberta que apresenta uma combinação não usual de centros ferro-enxofre. Foi assim designada por possuir um centro FeCis_4 do tipo desulforedoxina e ainda um centro monomérico de ferro (no estado ferroso) coordenado octaetricamente.¹⁶ Recentemente foi também possível isolar esta proteína no estado diférrico.¹⁷

II.2.2. O agregado [2Fe-2S]

Neste grupo podem distinguir-se dois tipos de centros ferro-enxofre dependendo do tipo de coordenação aos dois átomos de ferro. O agregado é composto por dois átomos de ferro ligados em ponte através de dois átomos de enxofre inorgânico. Cada átomo de ferro é coordenado ainda por mais dois resíduos de ácidos aminados pertencentes à cadeia polipeptídica (Figura II.1.B).

Nos agregados de $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$, a cadeia polipeptídica fornece quatro resíduos de cisteína que servem de ligandos dos dois átomos de ferro (do agregado). Os agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_4$ foram primeiramente identificados em ferredoxinas isoladas de plantas e cianobactérias, podendo no entanto, ser encontrados numa grande diversidade de organismos.^{18,19} As estruturas determinadas por cristalografia de Raios-X, para algumas destas proteínas revelam que, no agregado, cada átomo de ferro está coordenado tetraetricamente por dois átomos de enxofre inorgânico, que estabelecem a ponte, e por dois resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica.^{20,21,22} Este agregado está envolvido no transporte electrónico numa grande variedade de organismos fotossintéticos assumindo-se como receptor electrónico do fotossistema I.²⁰ Pode ainda servir de dador electrónico em várias reacções, tais como a redução da molécula de NADP^+ a NADPH , a redução do nitrito a amónia, a assimilação da molécula de sulfato ou a síntese da glutamina.^{23,24,25}

O outro tipo de agregados $[2\text{Fe-2S}]$ é o chamado agregado "Rieske". Foi assim designado por ter sido pela primeira vez descoberto por Rieske e colaboradores, numa proteína de ferro-enzofre que faz parte do sistema multi-enzimático do complexo III, isolada de mitocôndrias bovinas.^{26,27} Este tipo de agregado tem sido, também, detectado em várias di-oxigenases bacterianas que estão envolvidas na catálise de compostos orgânicos. Comparado com o agregado anteriormente descrito, difere no facto de um dos átomos de ferro ter uma coordenação mista, com dois sítios ocupados por dois resíduos de histidina e os outros dois, pelos átomos de enxofre inorgânico que medeiam a ponte entre os dois ferros.

II.2.3. O agregado $[4\text{Fe-4S}]$

Os agregados $[4\text{Fe-4S}]$ são, provavelmente, os agregados de ferro-enzofre mais abundantes e amplamente distribuídos na natureza. Têm sido extensivamente estudados através do uso de uma grande variedade de técnicas físico-químicas. Para o seu completo conhecimento foi decisiva a descoberta do agregado $[3\text{Fe-4S}]$.²⁸

A estrutura dos agregados $[4\text{Fe-4S}]$ está bem estabelecida através da cristalografia de Raios-X.^{29,30,31,32} Assim, sabe-se que os quatro átomos de ferro ocupam, em posições alternadas com quatro átomos de enxofre inorgânico, os vértices de um cubo. O agregado está ligado à cadeia polipeptídica através de quatro resíduos de cisteína, cada um dos quais está, por sua vez, ligado a um dos diferentes átomos de ferro. Assim, cada átomo de ferro do agregado pode ser entendido como uma unidade individual, tetraedricamente coordenado por três átomos de enxofre e um grupo tiolato de um resíduo de cisteína (Figura II.1C). A ligação ao grupo tiolato pode, em certos casos, ser substituída por grupos oxigenados, provenientes de outros ácidos aminados ou até por moléculas de solvente.^{33,34}

Do ponto de vista funcional, os agregados $[4\text{Fe-4S}]$ apresentam uma grande versatilidade, podendo ocorrer como unidades únicas, ou associados a outros co-factores. A possibilidade da sua interconversão num agregado $[3\text{Fe-4S}]$ permite um maior controlo da sua actividade (ver secção seguinte). Para além do seu importante papel no transporte de

electrões, estes centros podem desempenhar funções catalíticas. Exemplos de tais proteínas são a hidrogenase e as hidratase/desidratases do tipo da aconitase.^{35,36,37,38} Estão envolvidos em processos biológicos essenciais para o bom funcionamento da célula, nomeadamente, na redução da molécula de nitrito, na redução do sulfato, redução do CO₂, ou oxidação do piruvato.³⁹

Presentemente, com o desenvolvimento das técnicas usadas na caracterização das proteínas, os agregados [4Fe-4S] têm sido associados à catálise de vários compostos, envolvendo normalmente a interacção dos substratos com os agregados, sem alteração do seu estado de oxidação. A maioria, catalisa reacções de hidratação/desidratação, onde o agregado actua como um ácido de Lewis, tal como na aconitase.^{40,41,42} Um novo tipo de proteínas, com função reguladora, foi também descrita. Desta nova classe fazem parte, a IRE-BP (denominada proteína de ligação ao elemento regulador do ferro), uma proteína responsável pela regulação do nível de ferro no organismo, e a endonuclease III que actuando ao nível do DNA, controla a síntese proteica.⁴³

II.2.4. O agregado [3Fe-4S]

Este tipo de agregado é encontrado em muitas proteínas, principalmente nas ferredoxinas bacterianas. A sua caracterização foi possível através do intenso estudo espectroscópico da ferredoxina (Fd) isolada de *Azotobacter vinelandii*, da aconitase e da ferredoxina II de *D. gigas*.^{44,45,46} A sua estrutura terciária foi, mais tarde, determinada por cristalografia de Raios-X.^{4,47} O agregado [3Fe-4S] apresenta uma geometria cúbica, semelhante à do agregado [4Fe-4S], com um dos vértices desocupado (Figura II.1.D). Pensa-se que este agregado de ferro-enzofre tenha evoluído do agregado de [4Fe-4S] por perda de um átomo de ferro. O que é apoiado pela sua quase espontânea interconversão num agregado de [4Fe-4S], na presença de ferro.

Em determinadas proteínas, tais como a Fd II de *D. gigas*, o agregado [3Fe-4S] assume o papel de transportador electrónico entre diferentes componentes. Tem sido posta a hipótese deste agregado ter uma dupla função. Na ferredoxina de *D. vulgaris*, foi descrita a

ocorrência de interacção entre o agregado de ferro-enxofre e o RNA, implicando uma possível regulação da actividade enzimática pela acção do agregado nos organismos eucariontes, tal como a IRE-BP.⁴⁸ O papel do agregado [3Fe-4S] na aconitase continua por conhecer. No entanto, poderá representar o estado não activo da proteína, isto é, o estado no qual não funciona nem como aconitase nem como IRE-BP. Assim, este estado será fundamental na regulação destas actividades.

II.2.5. Interconversão entre os agregados [3Fe-4S] e [4Fe-4S]

A comparação do arranjo geométrico dos átomos nos agregados [3Fe-4S] e [4Fe-4S] e a consequente constatação da similaridade das suas geometrias, levantou a hipótese de interconversão entre estes centros. Os trabalhos efectuados na aconitase e na Fd II de *D. gigas* revelaram-se de extrema importância no campo da interconversão de centros de ferro-enxofre.^{45,49} No caso da aconitase foi observado que a forma activa da enzima contém um agregado [4Fe-4S], enquanto que na sua forma inactiva a enzima possui um agregado [3Fe-4S]. Por outro lado, a análise da estrutura de Raios-X da Fd II de *D. gigas* indica a presença de um quarto resíduo de cisteína nas proximidades dos restantes ligandos do agregado [3Fe-4S], que seria requerido para a ligação ao átomo de ferro adicional.⁴⁷

A conversão de um agregado [3Fe-4S] num de [4Fe-4S] é conseguida através da incubação em meio redutor da proteína com Fe^{2+} e S^{2-} , em condições anaeróbicas. A conversão, seguida por RPE, origina o aparecimento de um sinal rômbico do tipo " $g=1.94$ ", enquanto que no espectro de Mössbauer se observa um sinal típico dos agregados [4Fe-4S]. A formação de um agregado [4Fe-4S], a partir do de [3Fe-4S], pode também ser efectuada por reconstituição total a partir da apoproteína, em condições controladas.⁴⁹

A reacção inversa, transformação de um agregado [4Fe-4S] num de [3Fe-4S] é possível por incubação com um agente oxidante, usualmente ferricianeto de potássio.^{50,33} No espectro de RPE observa-se um sinal isotrópico centrado a $g=2.02$ e o aparecimento de dois dobletos, com intensidade 2:1, no espectro de Mössbauer.

As técnicas de interconversão e reconstituição de centros ferro-enxofre têm sido aplicadas em vários sistemas e permitiram a marcação isotópica selectiva de átomos de ferro nestes agregados, o que se revelou muito importante na percepção do mecanismo reaccional da aconitase (Figura II.2).³³

A fácil conversão do agregado [3Fe-4S] possibilita a formação de agregados heterometálicos, do tipo [M,3Fe-4S] pela inserção de um metal adicional no sítio desocupado, que podem assumir novas funções metabólicas, marcando um passo na evolução das espécies.^{30,51,52,53} De referir que foi, também, efectuada a reconstituição do agregado [3Fe-4S] da ferredoxina de *Pyrococcus furiosus* com tálio (Tl) e cério (Cs).⁵⁴ No caso do cério, verificou-se que devido ao seu tamanho e às suas propriedades, o ião Cs^+ não é incorporado no cubo, apesar de se ligar a um resíduo próximo da cadeia polipeptídica (Figura II.2).

II.2.6. Agregados com outras estequiometrias

No final da década de 70 Shah e Brill identificaram o primeiro agregado ferro-enxofre com mais de quatro átomos de ferro na proteína de ferro-molibdénio (proteína FeMo) do complexo enzimático da nitrogenase.⁵⁵ Os autores verificaram que o co-factor desta proteína, ao qual foi dado o nome de co-factor FeMoco, continha sete átomos de ferro e um átomo de molibdénio por cadeia polipeptídica.

As nitrogenases bacterianas desempenham um papel muito importante no ciclo do azoto, catalisando a redução do azoto molecular a amónia. Actualmente e com base na estrutura de cristalografia de Raios-X da nitrogenase, sabe-se que o complexo enzimático é constituído por uma proteína de ferro que é composta por duas subunidades que partilham um agregado de [4Fe-4S], e pela proteína FeMo.⁵⁶ Esta última é constituída por duas subunidades equivalentes, cada uma contendo um agregado P e uma co-factor FeMoco. O agregado P possui oito átomos de ferro e pode ser descrito como dois agregados [4Fe-4S] que partilham dois resíduos de cisteína como ligandos (Figura II.3A).

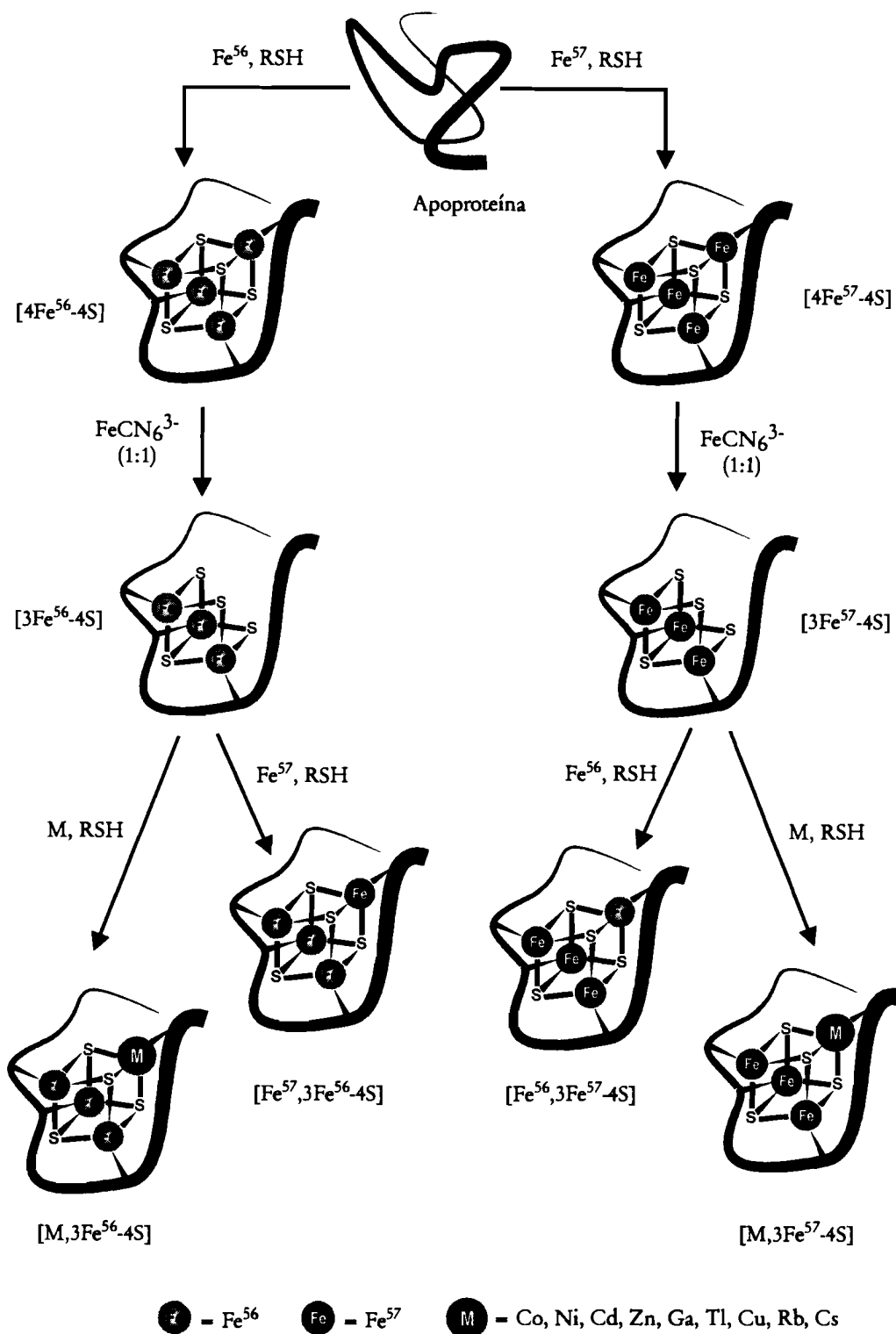


Figura II.2. Interconversão e reconstituição dos agregados $[\text{4Fe-4S}]$ e $[\text{3Fe-4S}]$. Marcação isotópica selectiva e formação de agregados heterometálicos.

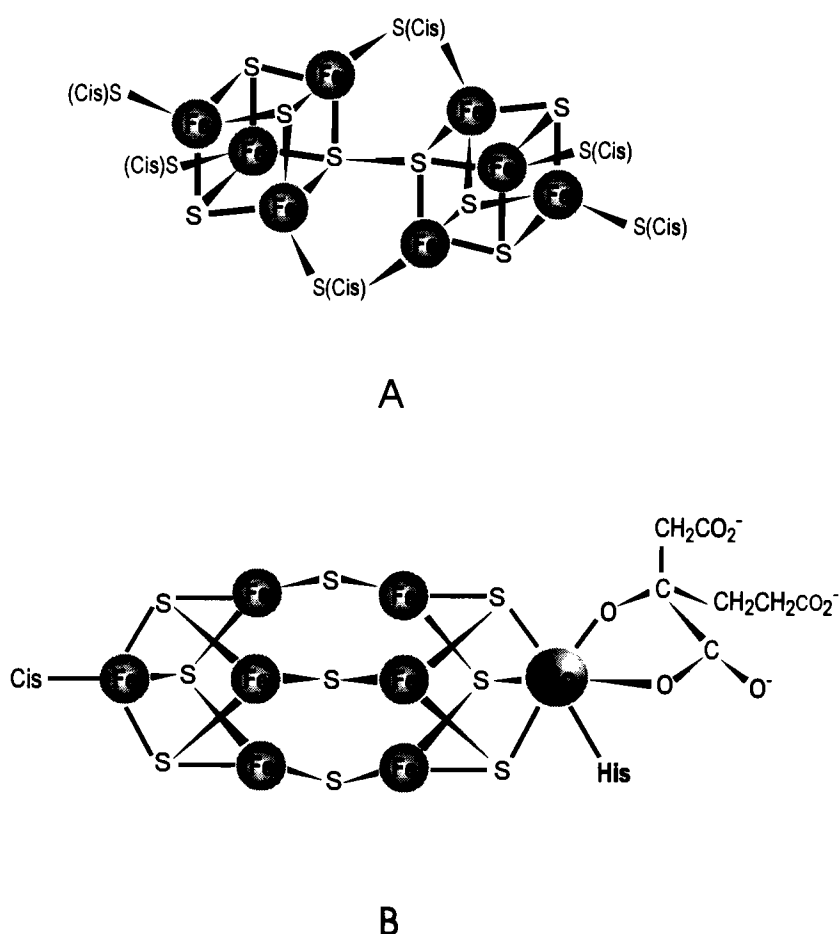


Figura II.3. As estruturas propostas para o agregado P (A) e o co-factor FeMoco (B) da nitrogenase de *Az. vinelandii*, determinadas por cristalografia de Raios-X (adaptado da referência 128).

Por sua vez, o co-factor FeMoco, contém sete átomos de ferro e um átomo de molibdénio, tal como proposto em 1977 por Shah.⁵⁵ Seis destes átomos de ferro encontram-se coordenados por apenas três enxofres inorgânicos e o sétimo ferro por mais um resíduo de cisteína. O átomo de molibdénio tem uma coordenação octaédrica da qual fazem parte três enxofres inorgânicos, um resíduo de histidina e dois átomos de oxigénio pertencentes aos grupos 2-hidroxilo e 2-carboxilo de uma molécula de homocitrato (Figura II.3B).

Em 1986 e pela primeira vez foram apresentadas algumas evidências que apontam para uma possível ocorrência de centros Fe-S com estequiometria superior a quatro e com uma geometria não cúbica.⁵⁷

Com base na análise do conteúdo em ferro e em enxofre inorgânico, foi sugerido que a hidrogenase de ferro de *D. vulgaris* Hildenborough continha, para além dos dois agregados [4Fe-4S], um agregado com uma nova estrutura constituído por aproximadamente seis átomos de ferro. Pensa-se que este agregado seja o sítio activo da enzima, tendo sido, por isso, denominado por agregado H. Uma possível evidência experimental que apoia esta hipótese vem da presença de uma ressonância no espectro de RPE situada a campo baixo, com valor de $g=5$.

Os dados de Mössbauer existentes presentemente são consistentes com o facto da maioria dos átomos de ferro estarem organizados em dois agregados de [4Fe-4S] do tipo da Fd I de *D. gigas* e revelam que no estado nativo da hidrogenase o agregado H é diamagnético.⁵⁸ Estudos de RPE mostram que o agregado H pode existir em diferentes estados paramagnéticos, um dos quais é caracterizado por valores de $g=2.07$, 1.96 e 1.89 , apresentando propriedades de saturação muito semelhantes às do centro I da redutase do APS.^{31,59,60} Dados recentes, obtidos pela espectroscopia de Ressonância de Raman na hidrogenase de *D. vulgaris*, apoiam a presença de dois agregados [4Fe-4S] e um terceiro agregado que, ou é constituído por mais do que quatro átomos de ferro, ou os átomos de ferro não se encontram coordenados a resíduos de cisteína.⁶¹ As características espectroscópicas únicas do agregado H implicam, provavelmente, uma nova estrutura do agregado Fe-S. No entanto, apesar do estudo intensivo os dados disponíveis não permitem concluir qual a possível estrutura deste agregado.

Recentemente foi detectada a presença de agregados ferro-enxofre do tipo [6Fe-6S] em proteínas isoladas das espécies *D. desulfuricans* ATCC 27774 e *D. vulgaris* Hildenborough.^{6,62} A proteína nativa exhibe um sinal a campo baixo com valor de $g=15.3$ indicando a presença de espécies com estados de spin $S=9/2$, nunca antes observados em sistemas biológicos. A identificação de um agregado [6Fe-6S] não teria sido conseguida sem

a combinação dos dados obtidos pelas espectroscopias de RPE e Mössbauer. O espectro de Mössbauer da proteína nativa, adquirido a 4.2 K, consiste de uma componente paramagnética e de um dobleto de quadrupolo com igual percentagem de absorção. O número de linhas e as intensidades relativas da componente magnética confirmam a existência de um agregado com seis átomos de Fe com coordenação a enxofres e azotos e/ou oxigénios.⁶

A possibilidade de ocorrência de agregados ferro-enxofre com mais de quatro átomos de ferro tem sido ainda sugerida para outras proteínas, nomeadamente, na redutase do sulfito de *D. vulgaris* Hildenborough, desidrogenase do CO ou redutase do APS (tema de outros capítulos deste trabalho).^{63,64,65}

II.3. Propriedades magnéticas e de oxidação-redução dos centros ferro-enxofre

A maioria das técnicas usadas na caracterização dos centros ferro-enxofre está relacionada com o estudo de diferentes estados de oxidação-redução que têm propriedades magnéticas específicas. Isto permitiu a extração de informação importante através do uso de técnicas espectroscópicas, nomeadamente as espectroscopias de RMN, RPE e Mössbauer.

As estruturas básicas dos centros ferro-enxofre foram descritas anteriormente e estão representadas na Figura II.1. Em todos os agregados os átomos de ferro encontram-se no estado de spin alto (isto é, têm o número máximo de electrões *d* desemparelhados), podendo existir em qualquer dos dois estados de oxidação, Fe^{3+} ou Fe^{2+} . A carga formal do agregado Fe-S apenas tem em conta os estados de oxidação dos átomos de ferro e dos enxofres inorgânicos. Por exemplo, para o caso do agregado $[\text{2Fe-2S}]$ no estado oxidado, a carga formal é igual a 2+, na medida em que possui dois ferros que se encontram no estado férrico (Fe^{3+}) ligados a dois enxofres (S^{2-}). A carga formal do centro é determinada pela soma algébrica das cargas dos átomos de ferro e dos átomos de enxofre.

Todos os tipos de centros ferro-enxofre apresentam uma grande variação do potencial de oxidação-redução (Tabela II.1). O potencial de oxidação-redução é controlado por vários factores, nomeadamente, pela polaridade do envelope que circunda o agregado, pela presença de pontes de hidrogénio, interacções electrostáticas e a basicidade dos ligandos que coordenam o ferro, entre outros.

II.3.1. O centro $FeCis_4$

As proteínas do tipo rubredoxina apresentam potenciais de oxidação-redução numa gama estreita, próxima de 0 mV. Este valor é relativamente elevado para células de bactérias anaeróbicas, envolvidas na redução dissimilativa do sulfato, levantando a questão sobre a função destas proteínas nestes microrganismos.

Podem ocorrer em dois estados de oxidação (Tabela II.1). No estado oxidado (nativo), o átomo de ferro do agregado $FeCis_4$ encontra-se no estado férrico de spin alto (Fe^{3+} , $S=5/2$), que confere uma cor avermelhada à proteína. O espectro de visível das rubredoxinas apresenta máximos de absorção a 492 e 365 nm (Tabela II.3).

O espectro de RPE é característico a todas as rubredoxinas isoladas até à data.⁶⁶ Caracteriza-se pela presença de ressonâncias a $g=4.3$ e $g=9.4$. Este espectro pode ser interpretado como resultante das transições entre os níveis de energia dos doubletos de Kramer com $m_s=\pm 3/2$ e do estado fundamental, respectivamente, com um valor de $E/D=0.28$.

O espectro de Mössbauer apresenta uma espécie magnética com picos bem definidos, característico de uma espécie monomérica com spin semi-inteiro.

A redução mono-electrónica destas proteínas, implica uma diminuição global da absorção do espectro de visível. O átomo de ferro encontra-se no estado $2+$, com $S=2$, sendo silencioso em RPE. O espectro de Mössbauer é constituído por um doubleto de quadrupolo com parâmetros característicos de Fe^{2+} tetraedricamente coordenado.⁶⁷

II.3.2. O agregado [2Fe-2S]

Os agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_2$ são normalmente isolados no estado oxidado, com os dois átomos de ferro no estado férrico, o que origina uma carga formal igual a 2+. Podem ainda existir no estado reduzido, através da introdução de um electrão, no qual um dos ferros está no estado ferroso e o outro no estado férrico, originando uma espécie paramagnética com $S=1/2$ (Tabela II.1).

O potencial de oxidação-redução destes agregados está compreendido entre -460 e -220 mV.⁶⁸ Uma excepção é constituída pelos agregados do tipo "Rieske" que possuem valores de potenciais muito positivos não usuais nestes centros, podendo variar entre -150 e +330 mV.

O espectro de visível das proteínas que contêm agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_2$ é caracterizado por picos de absorção máxima a 460, 420 e 330 nm. A redução da proteína, contrariamente aos outros agregados, pode não implicar uma diminuição global da absorção, tal como foi demonstrado na ferredoxina de espinafres e na adrenoxina.⁶⁹

A espectroscopia de RPE teve um papel crucial no estabelecimento da estrutura deste agregado. No estado oxidado é diamagnético ($S=0$) e, portanto, silencioso em RPE.

O espectro de Mössbauer correspondente ao estado oxidado apresenta duas linhas. Os parâmetros normalmente observados variam entre 0.50 e 0.80 mm/s para o desdobramento de quadrupolo (ΔE_Q) e entre 0.25 e 0.29 mm/s para o desvio isomérico (δ). A campos elevados, o espectro de Mössbauer apresenta três linhas com baixa resolução, correspondentes ao desdobramento de Zeeman, evidenciando a natureza diamagnética da espécie que resulta do acoplamento antiferromagnético dos átomos de ferro.⁷⁰

No estado reduzido, os agregados $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cis}_2$ são activos em RPE, com $S=1/2$, resultante do forte acoplamento antiferromagnético dos ferros. Os sinais podem ser rômbicos ou axiais, situados a campo alto. Apesar da anisotropia observada, verifica-se que dois valores de g são sempre inferiores ao do electrão livre e que o $g_{\text{médio}}$ é aproximadamente igual a 1.96 (Tabela II.3).²⁶

O espectro de Mössbauer da espécie reduzida, adquirida a temperatura alta, é constituído por dois dobletos de quadrupolo, com intensidades semelhantes. Os parâmetros para os dois dobletos são os seguintes: para o primeiro dobleto, $\Delta E_{Q1} = 0.59-0.97$ mm/s e $\delta_1 = 0.30-0.35$ mm/s, e para o segundo dobleto, $\Delta E_{Q2} = 2.63-3.14$ mm/s e $\delta_2 = 0.55-0.65$ mm/s. O dobleto 1 é atribuído ao átomo de ferro no estado férrico, enquanto que o dobleto com maior desvio isomérico corresponde ao ferro ferroso.

II.3.3. O agregado [4Fe-4S]

Os agregados [4Fe-4S] podem existir em três diferentes estados de oxidação: [4Fe-4S]³⁺, [4Fe-4S]²⁺ e [4Fe-4S]¹⁺ (Tabela II.1).

Na maioria das proteínas que contêm estes centros, cujo caso mais simples corresponde às ferredoxinas, o estado de oxidação varia entre os estados [4Fe-4S]²⁺ e [4Fe-4S]¹⁺. A gama de potenciais de oxidação-redução associada à transição 2+ → 1+, deste tipo de agregado é muito larga, variando entre -645 e 0 mV. Apenas as proteínas denominadas HiPIP (proteínas de ferro de potencial elevado), podem apresentar o agregado nos estados [4Fe-4S]³⁺ ou [4Fe-4S]²⁺. A transição entre estes dois estados ocorre a potenciais bastante positivos, compreendidos entre +50 e +450 mV.

No estado oxidado, o espectro de visível dos agregados [4Fe-4S] exhibe bandas de absorção muito alargadas entre 400 e 380 nm, conferindo uma coloração acastanhada às proteínas que os possuem. Tal como na maioria das proteínas de ferro-enxofre, a redução implica uma diminuição global da absorção. No entanto, em algumas proteínas HiPIP, foi observado o aparecimento de um pico de absorção máxima centrada a 388 nm.⁷¹

No estado [4Fe-4S]²⁺, o agregado é diamagnético (*S*=0) e portanto silencioso em RPE. O espectro de Mössbauer (adquirido na ausência de campo magnético) consiste num dobleto de quadrupolo com parâmetros geralmente observados iguais a: $\Delta E_Q = 0.7-1.5$ mm/s e $\delta = 0.37-0.46$ mm/s. Este facto traduz a presença de deslocalização de valência. A não equivalência dos átomos de ferro implica também que os picos de absorção

sejam largos.⁷² Excepcionalmente, o espectro da Fd I de *D. gigas* possui um dobleto de quadrupolo adicional, resultante da presença de um átomo de ferro com um carácter férrico mais acentuado.

No estado reduzido, $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, tipicamente representado pela forma reduzida da ferredoxina I de *D. gigas*, os agregados apresentam sinais rômnicos no espectro de RPE, com valores de g iguais a 2.07, 1.94 e 1.91. Este sinal é normalmente denominado por sinal do tipo " $g=1.94$ ".⁶⁸ O sinal " $g=1.94$ " pode ser explicado assumindo que o agregado é constituído por dois pares de ferros acoplados. Deste modo, existe um par de átomos de ferro com estado de spin $S=9/2$ gerado pelo acoplamento ferromagnético entre o ferro férrico ($S=5/2$) e um dos ferros ferrosos ($S=2$); o segundo par, resulta do acoplamento ferromagnético dos dois átomos de ferros ferrosos restantes ($S=2$), originando um estado de spin com $S=4$. O acoplamento antiferromagnético destas duas subestruturas origina o aparecimento do sinal " $g=1.94$ ", característico de um sistema com $S=1/2$.

O espectro de Mössbauer referente ao estado $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ é composto por dois dobletos de quadrupolo correspondentes aos dois pares de ferros atrás descritos.⁷² Os parâmetros normais associados a este estado são: $\Delta E_Q = 0.60\text{-}2.60$ mm/s e $\delta = 0.43\text{-}0.62$ mm/s. São conhecidas algumas excepções que apresentam valores mais elevados, nomeadamente a aconitase reagida com substrato ($\Delta E_Q = 0.95\text{-}1.91$ mm/s e $\delta = 0.69\text{-}0.71$ mm/s) e o centro I da redutase do APS ($\Delta E_Q = 1.5\text{-}2.2$ mm/s e $\delta = 0.54\text{-}0.63$ mm/s). Por outro lado, foram descobertas proteínas que possuem agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ com spin global superior a $1/2$. Um exemplo consiste na proteína de ferro da nitrogenase que contém um agregado $[4\text{Fe-4S}]$. Na espectroscopia de RPE, para além dos sinais a campo alto com valores de $g=2.05$, 1.94 e 1.88 típicos de uma agregado $[4\text{Fe-4S}]$ no estado reduzido, são observadas ressonâncias adicionais a $g=5.8$ e 5.1. Usando várias técnicas espectroscópicas (RPE, Mössbauer, e Susceptibilidade Magnética) estas ressonâncias foram atribuídas a um sistema de spin com $S=3/2$.

No estado mais oxidado das proteínas HiPIP, $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, os sinais observados no espectro de RPE situam-se a valores de superiores a $g=2$. O sistema apresenta uma estado de

spin $S=1/2$, que resulta de um esquema de acoplamento semelhante ao do agregado $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ da Fd I de *D. gigas*.⁷³ Neste caso, no entanto, existem três átomos de ferro no estado $3+$ e um no estado ferroso (Tabela II.1). O acoplamento antiferromagnético de um par diférico ($S=5$) com um par misto férrico-ferroso ($S=9/2$) resulta num estado de spin com $S=1/2$. O espectro de Mössbauer é composto por uma componente magnética correspondente a dois sítios distintos.

II.3.4. O agregado $[3\text{Fe-4S}]$

Os agregados $[3\text{Fe-4S}]$ são também isolados no estado oxidado. Absorvem no visível na região entre os 400 e os 380 nm, tal como os $[4\text{Fe-4S}]$, sendo por isso difícil distingui-los usando apenas esta técnica.

Existem em dois estados de oxidação: o estado oxidado, $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$, com $S=1/2$, no qual os três átomos de ferro se encontram no estado férrico; e o estado reduzido obtido pela introdução de um electrão, $[3\text{Fe-4S}]^0$, com dois ferros no estado férrico e o terceiro no estado ferroso, resultando num sistema com spin $S=2$. A redução destes agregados ocorre numa gama de potenciais de oxidação-redução equivalente à dos agregados tetranucleares.

A identificação dos agregados $[3\text{Fe-4S}]$ só foi possível pela conjugação dos resultados obtidos por várias técnicas, principalmente através da combinação das espectroscopias de RPE e de Mössbauer. Um estudo detalhado deste tipo de centro de ferro-enxofre foi efectuado na Fd II de *D. gigas*.⁴⁶

O espectro de RPE da forma oxidada, $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$, revela uma espécie praticamente isotrópica, a campo alto, centrada a aproximadamente $g=2$. A espectroscopia de Mössbauer mostra que todos os átomos de ferro se encontram no estado férrico de spin alto ($S=5/2$), participando no acoplamento antiferromagnético.⁷⁴

No estado reduzido os agregados são também paramagnéticos de spin inteiro, com $S=2$. O estado de spin pode ser explicado como resultante do acoplamento entre um par de valência mista férrico-ferroso ($S=9/2$) com o terceiro ferro férrico ($S=5/2$).

A espectroscopia de Mössbauer evidencia a presença de uma valência mista (2.5+) de um par de ferros, indicando que o electrão proveniente da redução é partilhado pelos dois átomos ($\text{Fe}^{3+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}$). A baixa temperatura o espectro consiste em dois dobletos de quadrupolo: um dobleto com parâmetros típicos de Fe^{3+} ($\Delta E_{Q1} = 0.40\text{-}0.47$ mm/s e $\delta_1 = 0.29\text{-}0.30$ mm/s), que contribui com 1/3 da intensidade total do espectro; e um segundo dobleto com valores de ΔE_Q e δ intermédios aos dos estados oxidado e reduzido da rubredoxina, respectivamente, ($\Delta E_{Q2} = 1.40\text{-}1.47$ mm/s e $\delta_2 = 0.46\text{-}0.47$ mm/s).

Tabela II.1
Estados de oxidação dos centros ferro-enxofre

Centro Fe-S	Estado de oxidação do centro Fe-S		Valência dos átomos de ferro	Multiplicidade de spin (S)	Gama de potenciais de oxidação-redução (mV)
FeCis ₄	oxidado	3+	Fe^{3+}	5/2	-60 a +20
	reduzido	2+	Fe^{2+}	2	
[2Fe-2S]	oxidado	2+	$\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{3+}$	0	-460 a +300
	reduzido	1+	$\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$	1/2	
[3Fe-4S]	oxidado	1+	3 Fe^{3+}	1/2	-460 a -50
	reduzido	0	2 $\text{Fe}^{2.5+}, \text{Fe}^{3+}$	2	
[4Fe-4S]	HiPIP _{ox}	3+	3 $\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$	1/2	+50 a +450
	HiPIP _{red} , Fd _{ox}	2+	2 $\text{Fe}^{3+}, 2 \text{Fe}^{2+}$	0	
	Fd _{red}	1+	$\text{Fe}^{3+}, 3 \text{Fe}^{2+}$	1/2	-645 a 0

II.4. O papel não-redox dos agregados [4Fe-4S]

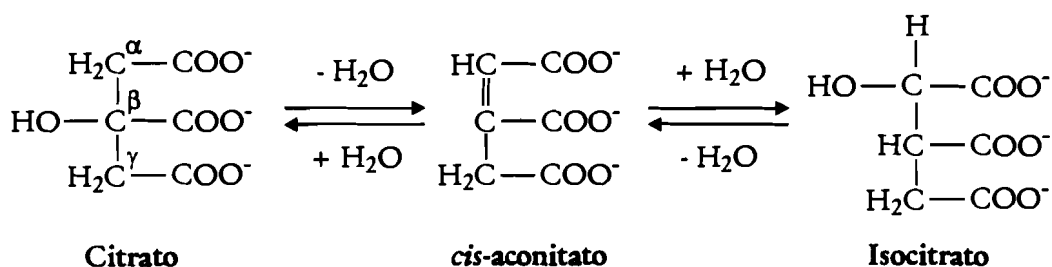
Como anteriormente já referido, existem proteínas de ferro-enzofre que não estão envolvidas em reacções de oxidação-redução ou de transferência electrónica, tal como as ferredoxinas. Sabe-se hoje que os centros de ferro-enzofre podem interagir directamente com moléculas de substratos, assumindo funções fisiológicas até agora desconhecidas. Destes são exemplos a aconitase, que constitui o caso mais conhecido da família das hidratases/desidratases apresentando-se como uma enzima "multifacetada", ou a endonuclease III que está envolvida na reparação e estabilização do DNA. Como de seguida veremos, o bifuncionalismo da aconitase traduz-se na sua capacidade de introduzir uma molécula de água numa ligação dupla do *cis*-aconitato ou, dependendo da concentração de ferro na célula, constituir um sensor da actividade das enzimas envolvidas no transporte e armazenamento do ferro.

De seguida serão dados alguns exemplos de enzimas que contêm centros de ferro-enzofre com funções não-redox. O papel destas enzimas poderá ser comparado ao da redutase do APS, que medeia a conversão reversível de APS em sulfito e AMP. A reacção parece envolver a interacção da molécula de AMP (reacção inversa) com um dos agregados do tipo [4Fe-4S] presentes na enzima.⁷⁵

II.4.1. O bifuncionalismo da aconitase

II.4.1.1. O papel enzimático da aconitase

A aconitase (hidro-liase do citrato ou do isocitrato) representa uma das enzimas mais bem caracterizadas, graças ao trabalho de Beinert e colaboradores.^{2,33} Descoberta em 1937 por Martius, apenas em 1972 foi identificada como uma proteína de ferro-enzofre. É uma proteína de massa molecular entre 80 e 83 kDa que catalisa a reacção reversível de hidratação/desidratação do citrato e do 2R,3S-isocitrato, via o intermediário alílico *cis*-aconitato, sendo um passo chave do ciclo de Krebs.



Quando purificada aerobicamente a aconitase apresenta-se na forma inactiva. Nesta forma a aconitase contém um agregado ferro-enzofre do tipo [3Fe-4S], que se encontra ligado à proteína através dos resíduos de cisteína situados nas posições 358, 421 e 424.⁷⁶

A activação da enzima pode ser efectuada pela adição anaeróbica de ferro, em condições redutoras. Na forma activa, a proteína contém um agregado [4Fe-4S] no estado oxidado 2+. Por redução mono-electrónica é produzida a forma [4Fe-4S]¹⁺, que apresenta aproximadamente 30% da actividade total da enzima na forma 2+.³³ Ambos os estados ligam os substratos citrato, cis-aconitato ou isocitrato.

Pela aplicação de várias técnicas, especialmente as espectroscopias de RPE e Mössbauer, em combinação com métodos químicos, observou-se que o processo de activação da aconitase envolve a conversão de um agregado [3Fe-4S] num de [4Fe-4S]. Verificou-se também que o ferro adicionado durante a reacção constitui um sítio específico do agregado, designado por Fe_a, ao qual o substrato se liga.

A pH > 9, a forma inactiva [3Fe-4S]¹⁺ é convertida numa forma linear (não activa) derivada da substituição da ligação ao resíduo Cis358 pelos resíduos Cis250 e Cis257. Esta forma da aconitase foi denominada aconitase púrpura, por apresentar essa coloração. A aconitase púrpura não é activa, mas 60% da actividade pode ser recuperada por redução na presença de ferro, indicando que o agregado linear é convertido na forma activa [4Fe-4S]¹⁺.⁷⁷ A facilidade de interconversão das diferentes formas possibilitaram a marcação isotópica selectiva, pertimindo "olhar" para os diferentes sítios do agregado. Se a activação da enzima for efectuada pela adição de ⁵⁷Fe obtém-se um agregado do tipo [⁵⁷Fe_a3⁵⁶Fe-4S]²⁺ com o sítio Fe_a marcado. Contrariamente, a marcação dos restantes três

sítios requer a obtenção da apoenzima e a reconstituição do centro ferro-enxofre com ^{57}Fe obtendo-se a forma activa $[\text{}^{56}\text{Fe}_2\text{}^{57}\text{Fe-4S}]^{2+}$.

Na forma inactiva, o agregado $[\text{3Fe-4S}]$ encontra-se no estado oxidado e caracteriza-se por um sinal em RPE, quase isotrópico centrado a $g=2.01$, cuja intensidade se anula após redução da amostra. O espectro de Mössbauer consiste num dobleto de quadrupolo com parâmetros característicos de um agregado ferro-enxofre com $S=1/2$, em que os átomos de ferro de spin alto se encontram antiferromagneticamente acoplados ($\Delta E_Q = 0.71 \text{ mm/s}$ e $\delta = 0.27 \text{ mm/s}$). A redução mono-electrónica implica a transição do estado de oxidação do agregado de $1+$ a 0 , e é caracterizada em RPE por um sinal alargado situado a campo baixo, entre 0 e 50 mT . O espectro de Mössbauer de uma amostra enriquecida com ^{57}Fe é simulado por dois dobletos de quadrupolo de intensidade $2:1$, que como já vimos resultam de uma deslocalização de valência, em que o electrão que entra é partilhado preferencialmente por um par misto férrico-ferroso (valência $2.5+$), enquanto que o outro átomo de ferro permanece no estado $3+$ (Tabela II.4).^{78,79}

A forma activa da aconitase, produzida por adição de ferro à enzima inactiva, contém um agregado diamagnético do tipo $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, que por redução origina um espécie activa em RPE. A espectroscopia de RPE do agregado $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ mostra um sinal rômbico do tipo " $g=1.94$ ", com valores de g iguais a 2.06 , 1.93 e 1.86 . Os espectros de Mössbauer de amostras isotopicamente marcadas com $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ durante o processo de activação, evidenciam a conversão do agregado $[\text{3Fe-4S}]$ num agregado $[\text{4Fe-4S}]$. O espectro da forma $[\text{}^{56}\text{Fe}_2\text{}^{57}\text{Fe-4S}]^{2+}$, adquirido a 4.2 K a campo zero, é constituído por um dobleto de quadrupolo com os seguintes parâmetros: $\Delta E_Q = 1.30 \text{ mm/s}$ e $\delta = 0.45 \text{ mm/s}$. Estes valores são típicos de um agregado $[\text{4Fe-4S}]$ no estado $2+$. Se, por outro lado, a activação da aconitase for feita pela adição de ^{57}Fe observam-se dois dobletos distintos. Um dobleto é característico de um ião ferroso mononuclear (atribuído a ferro adventício) e o segundo dobleto (denominado dobleto α) tem parâmetros ($\Delta E_Q = 0.80 \text{ mm/s}$ e $\delta = 0.45 \text{ mm/s}$) característicos de um $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$. Este dobleto α foi atribuído ao quarto sítio do agregado, o sítio Fe_2 .⁸⁰

A redução mono-electrónica da forma activa da aconitase ($[4\text{Fe-4S}]^{2+} \rightarrow [4\text{Fe-4S}]^{1+}$) com ditionito de sódio ou por foto-redução na presença de deazaflavina, implica a formação de um par diferroso, tal como descrito para a generalidade dos agregados $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$.⁸¹

A adição de substrato à forma activa da aconitase origina alterações drásticas nos espectros de RPE e Mössbauer. O efeito da ligação do substrato à enzima foi descoberto pela primeira vez pela espectroscopia de RPE da forma $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$. Na presença de substrato os valores de g são desviados para valores mais baixos, $g=2.04, 1.85, 1.78$, o que indica que o substrato induz uma alteração significativa nas propriedades do agregado.

A adição de substrato à forma $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ origina um aumento do carácter ferroso do sítio Fe_a , enquanto que o outro par de ferros mantém as suas propriedades magnéticas. Quando se adiciona citrato à enzima na forma $[^{57}\text{Fe}_2^{56}\text{Fe-4S}]^{2+}$ (activação da enzima com ^{57}Fe) verifica-se o aparecimento de duas novas componentes, no espectro de Mössbauer adquirido a 4.2 K com um campo aplicado paralelamente ao feixe de radiação γ , de 60 mT. Os parâmetros observados para o duplete 1 (denominada espécie S_1) são os seguintes: $\Delta E_{Qs1} = 1.26 \text{ mm/s}$ e $\delta_{s1} = 0.84 \text{ mm/s}$ e para o duplete 2 (denominada espécie S_2): $\Delta E_{Qs2} = 1.83 \text{ mm/s}$ e $\delta_{s2} = 0.89 \text{ mm/s}$.⁸⁰ Através de técnicas de congelação rápida ("rapid freezing") acopladas à espectroscopia de Mössbauer, demonstrou-se que as espécies S_1 e S_2 resultam da ligação de citrato e isocitrato, respectivamente. A proporção relativa de cada uma das espécies em solução depende da forma de substrato adicionada e do tempo de reacção.⁸¹ Os valores de ΔE_Q e de δ para as espécies S_1 e S_2 , são muito elevados quando comparados com os restantes agregados $[4\text{Fe-4S}]$. Os valores de desvio isomérico são da ordem de grandeza dos observados em complexos de ferro ferroso de spin alto ($\delta = 0.7\text{-}1.4 \text{ mm/s}$), o que levou à hipótese de um aumento da esfera de coordenação do átomo Fe_a , de tetra para penta ou hexa-coordenado.⁸⁰

Na reacção complementar ou seja, a activação com ^{56}Fe ($[^{56}\text{Fe}_2^{57}\text{Fe-4S}]^{2+}$), as propriedades dos átomos de ferro do agregado não sofrem grandes alterações com a adição de substrato ($\Delta E_Q = 1.15\text{-}1.3 \text{ mm/s}$). Deste modo, verifica-se que apenas o sítio Fe_a é

requerido para a ligação do citrato (ou do isocitrato), sendo portanto essencial para a actividade da aconitase.³³

Pela espectroscopia dupla do electrão-núcleo (ENDOR) foi possível obter mais informação não só acerca do tipo de ligandos do agregado, mas também do tipo de ligação do substrato (ou inibidores).^{82,83,84} A permuta química de protões com o solvente ou a ligação do próprio solvente pôde também ser estudada. Desde modo demonstrou-se, por espectroscopia de ENDOR aplicada em amostras em $^1\text{H}_2\text{O}$ e $^2\text{H}_2\text{O}$, que o átomo Fe_a se encontra coordenado por um grupo hidroxilo que, com a adição do substrato, sofre protonação, ocorrendo a libertação de uma molécula de água.⁸⁴ O uso dos substratos isotopicamente marcados com ^{13}C e ^{17}O , em diferentes posições, permitiu determinar o modo de ligação do substrato ao agregado. Assim, a ligação do substrato ao agregado ferro-enxofre é efectuada pelo sítio Fe_a , sendo mediada pelos grupos carboxílicos α (no caso do isocitrato) ou β (para o citrato) e pelo grupo hidroxilo dos substratos. A ligação do substrato ao átomo Fe_a implica uma mudança da coordenação do ferro que passa de tetraédrica para octaédrica.³³

Pela combinação da espectroscopia de ENDOR com a espectroscopia de Mössbauer verificou-se que os quatro átomos de ferro do agregado $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ não são equivalentes e que, quando o substrato é adicionado às formas $2+$ ou $1+$, ocorre uma significativa alteração da densidade electrónica. A maior alteração ocorre na forma $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ reagida com substrato, em que a valência do átomo Fe_a passa de $\text{Fe}^{-2.5+}$ para Fe^{-2+} . Pensa-se que esta localização e mudança da carga do Fe_a seja a base do papel do centro ferro-enxofre no processo catalítico da aconitase.

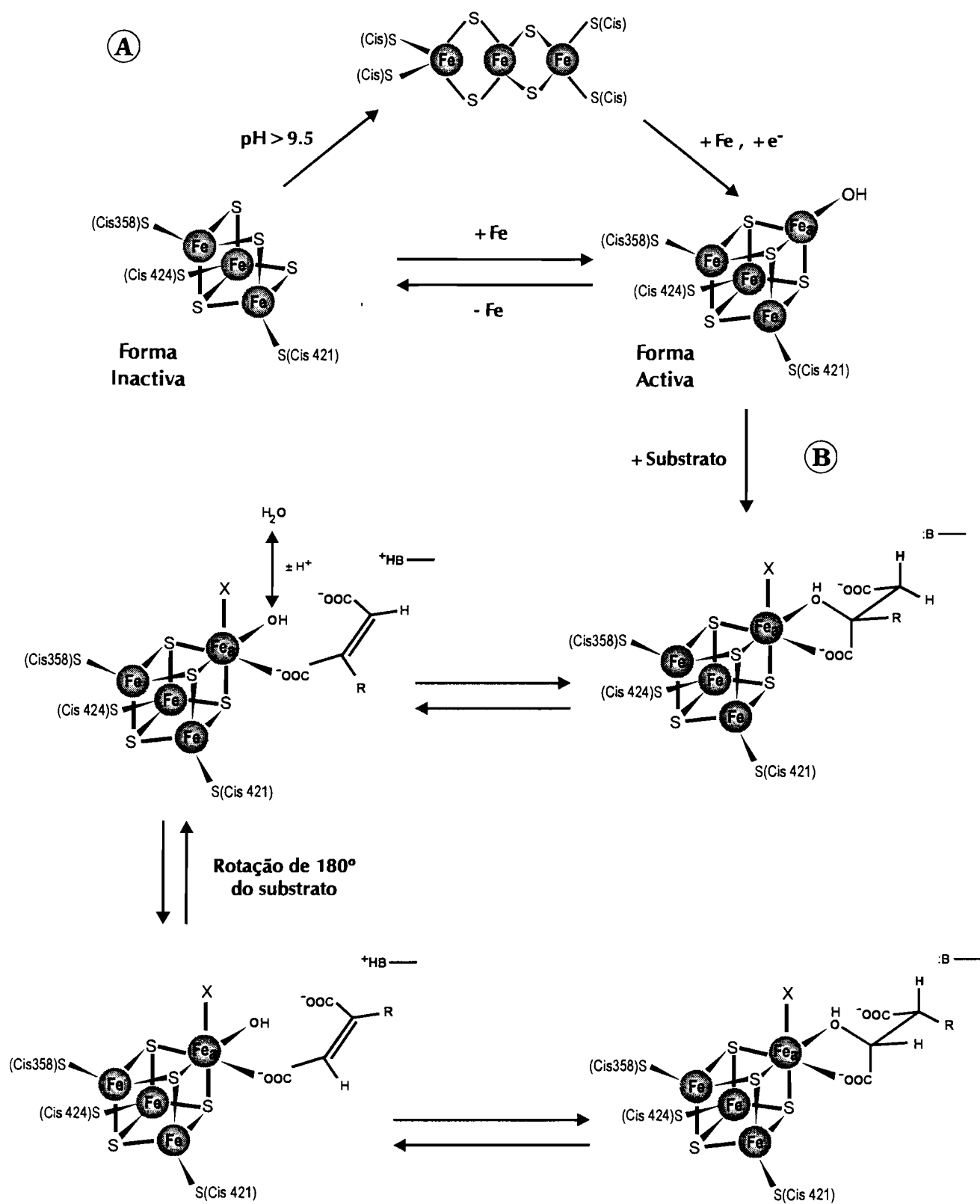
A estrutura terciária da aconitase (ligada ou não ao substrato) é já conhecida, através da cristalografia de Raios-X.^{85,86,87} A estrutura revela que a aconitase apresenta uma forma globular constituída por quatro domínios. Os três primeiros domínios, localizados na região N-terminal, encontram-se muito próximos e em associação, originando a formação de uma cavidade que constitui o sítio activo. O quarto domínio, na região C-terminal, está ligado aos restantes através de uma cadeia de ácidos aminados denominada

"hinge/linker", que cria um extenso fosso ("cleft") entre os domínios 1-3 e o domínio 4.⁸⁷ O agregado Fe-S constituinte do sítio activo está situado no fundo do fosso. Vinte e três resíduos de ácidos aminados pertencentes aos quatro domínios participam na formação do sítio activo, à volta do agregado [4Fe-4S], facilitando deste modo a entrada do substrato.

Com base nos dados obtidos pela aplicação das diferentes técnicas foi proposto um mecanismo reaccional para a aconitase que está representado na Figura II.4. O processo de isomerização das moléculas de citrato ou isocitrato, via o intermediário *cis*-aconitato, envolve a transferência de um protão, que se pensa pertencer ao resíduo de serina localizado na posição 642 (Ser642). O átomo de hidrogénio da Ser642 encontra-se espacialmente bem posicionado em relação ao oxigénio do grupo hidroxilo que liga ao agregado favorecendo a interacção. A ligação do substrato ao agregado implica, deste modo, a protonação do grupo hidroxilo que coordena o átomo Fe_a, através da serina Ser642. Na presença de *cis*-aconitato, a molécula de água ligada ao átomo de Fe_a pode ser permutada por uma molécula de água do solvente.

O agregado Fe-S actua, por um lado, como um ácido de Lewis facilitando a hidratação do citrato (ou isocitrato) e por outro, como activador do átomo de carbono adjacente ao grupo carboxilo do intermediário *cis*-aconitato, permitindo o ataque do hidroxilo que também se encontra ligado ao átomo Fe_a (o substrato encontra-se covalentemente ligado através dos grupos carboxilo e hidroxilo). Devido à estereo-especificidade da reacção, à transferência específica do protão da molécula de citrato para o isocitrato, e à coordenação do Fe_a do agregado, a molécula de *cis*-aconitato é obrigada a desligar-se do sítio activo e rodar 180° durante o processo catalítico.^{33,88}

Figura II.4. Mecanismo reaccional proposto para a aconitase. (A) Descrição esquemática da interconversão das várias formas do agregado ferro-enxofre da aconitase, incluindo o processo de activação da aconitase pela incubação anaeróbica da enzima com ferro, em condições redutoras e (B) Ligação da molécula de substrato e formação de uma esfera de coordenação octaédrica ao átomo Fe_a do agregado Fe-S. O grupo R do substrato representa CH_2COO^- ; -B: corresponde ao resíduo de serina na posição 642 da cadeia polipeptídica que transfere, estereoespecificamente, um protão entre o citrato e o isocitrato; e X poderá ser uma molécula de água ou o ligando do agregado (adaptado das referências 33 e 88).



II.4.1.2. O papel regulatório da aconitase

Com a excepção de algumas espécies pertencentes aos géneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, todos os organismos requerem ferro para o seu crescimento e para uma grande variedade de vias metabólicas, sendo portanto um elemento indispensável à célula. Devido à sua baixa solubilidade assim como à sua toxicidade é necessário um controlo rigoroso dos processos a ele associados, nomeadamente o transporte, armazenamento, disponibilidade e utilização. A nível celular, a concentração de transferrina e de ferritina, duas proteínas responsáveis pela aquisição e armazenamento do ferro, respectivamente, é regulada através do controlo da translação dos seus mRNAs, que por sua vez depende do nível intracelular de ferro.⁸⁹ Ambos os receptores destas proteínas contêm os chamados elementos reguladores do ferro (IREs). Os IRE são estruturas de RNA em forma de ansa localizadas na região não translacionada dos respectivos mRNAs, ocorrendo na região 3' do mRNA do receptor da transferrina e na região 5' do mRNA da ferritina. Para que a resposta ao ferro seja positiva, existe uma proteína que se liga aos IREs denominada proteína de ligação ao elemento regulador do ferro (IRE-BP). A ligação da IRE-BP ao IRE só ocorre quando o nível celular de ferro é baixo, inibindo simultaneamente a translação do mRNA da ferritina e a degradação do mRNA receptor da transferrina. Quando a concentração de ferro é elevada a afinidade da IRE-BP para o IRE é baixa.⁹⁰ Deste modo, a IRE-BP exerce um controle simultâneo e recíproco da concentração de ferritina e do receptor da transferrina, dependente do nível intracelular de ferro.

A comparação da sequência de ácidos aminados da aconitase mitocondrial de porco com a sequência da IRE-BP isolada de células humanas revelou 30% de homologia.^{87,91} O alinhamento das sequências das duas proteínas demonstrou que os 23 ácidos aminados que constituem o sítio activo da enzima são idênticos na aconitase mitocondrial de porco e na IRE-BP de células humanas. Esta identidade sugere que a IRE-BP possa, também, ser uma aconitase, o que foi confirmado mais tarde, pelo facto da IRE-BP "recombinada" apresentar actividade aconitase.⁹² Recentemente, foi também purificada uma aconitase citosólica bovina que apresenta actividade de ligação ao IRE e que pode conter um agregado Fe-S com

geometria cúbica. A análise da sua sequência de ácidos aminados revelou que a proteína é idêntica à IRE-BP.⁹³ Conclui-se assim, que a aconitase citosólica é uma proteína de ligação ao elemento regulador do ferro.

É bem conhecido o facto de a actividade de aconitase ter sido detectada quer nas mitocôndrias, como um componente do ciclo de Krebs, quer no citosol. Em células humanas, a aconitase mitocondrial é codificada por um gene situado no cromossoma 22, enquanto que a aconitase citosólica é codificada por um gene localizado no cromossoma 9. A aconitase citosólica apresenta propriedades enzimáticas muito semelhantes às da aconitase mitocondrial, mas a razão da sua existência não é conhecida.⁹⁴

O facto da IRE-BP possuir um agregado Fe-S foi surpreendente do ponto de vista bioquímico. Com base nas propriedades peculiares do agregado da aconitase foi proposto um mecanismo em que este agregado Fe-S funciona como um sensor do nível de ferro na célula. O modelo sugere que o átomo de ferro Fe_a ao qual se liga o substrato, seja responsável pela activação/inactivação da actividade de ligação ao RNA. Dependendo da concentração de ferro a estrutura do agregado Fe-S sofrerá uma alteração permitindo a mudança no comportamento funcional da enzima. Na realidade, observou-se que a IRE-BP isolada de células com uma elevada concentração de ferro, apresenta uma baixa actividade de ligação ao RNA, mas possui actividade total de aconitase, o que demonstra que quando o nível de ferro é elevado a célula produz uma forma de proteína que contém um agregado [4Fe-4S]. Contrariamente, IRE-BP isolada de células com uma baixa concentração de ferro, liga-se ao RNA com uma elevada afinidade não apresentando, contudo, qualquer actividade de aconitase.⁹⁵

Na Figura II.5 apresenta-se o modelo estrutural proposto para a regulação da IRE-BP. Neste modelo assumem-se duas conformações, aberta e fechada, consoante a presença/ausência do agregado ferro-enzofre na molécula. Quando a proteína contém um agregado Fe-S ([3Fe-4S] ou [4Fe-4S]) e o substrato, o domínio quatro encontra-se espacialmente próximo dos restantes domínios. Esta conformação corresponde, então, à conformação fechada, possuindo actividade de aconitase na presença do agregado [4Fe-4S].

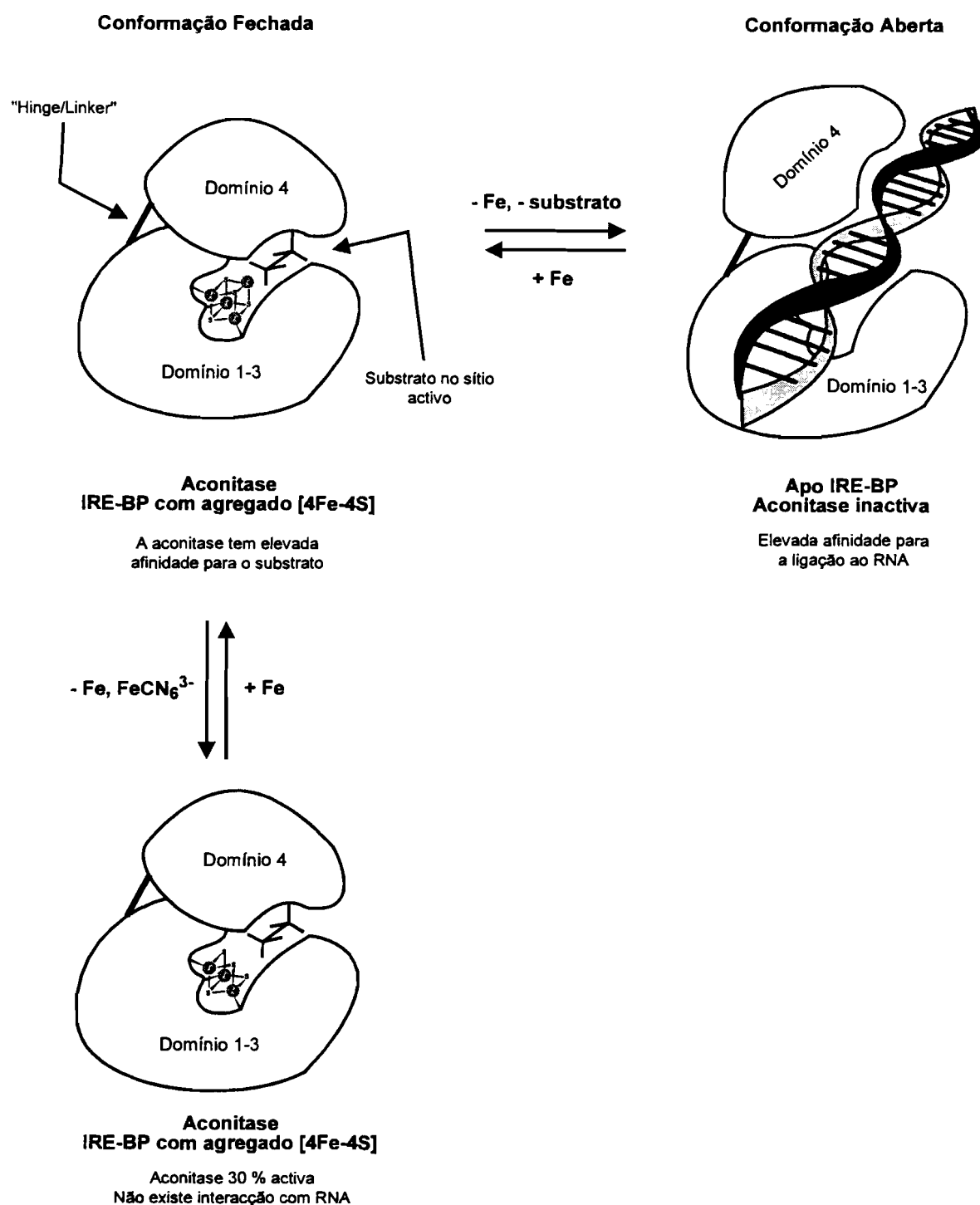


Figura II.5. Modelo de regulação da IRE-BP. Ambas as formas [3Fe-4S] e [4Fe-4S] interagem com o substrato, no entanto, apenas a forma tetranuclear é activa. O substrato contribui para a manutenção da conformação fechada da proteína. A perda do agregado e do substrato implica uma alteração da estrutura conformacional da IRE-BP originando a conformação aberta, que permite a interacção com o elemento IRE da molécula de RNA (adaptado de 89 e 96).

Contrariamente, à conformação aberta corresponde a forma da proteína que não contém qualquer agregado e na qual o domínio quatro está mais distante dos restantes domínios. Este facto permite a aproximação e a interacção da molécula de RNA. Ou seja, a ausência do agregado e concomitante perda do substrato resulta numa alteração conformacional, permitindo a adopção de uma nova função por parte da proteína.^{95,89}

II.4.2. A endonuclease III

A endonuclease III isolada de *E. coli* é uma enzima que repara o DNA danificado actuando, quer como *N*-glicosilase do DNA por remoção das bases pirimidínicas oxidadas, quer como liase das bases apurínicas/apirimidínicas (AP) introduzindo uma "single strand nick" no sítio AP onde a base foi removida, através de uma reacção de eliminação β .^{97,98}

Foram já descritas várias enzimas com a mesma actividade reparadora, isoladas de células bovinas, humanas ou de leveduras. Tal como a endonuclease III, são proteínas de baixa massa molecular variando entre 25 e 42 kDa. Contrariamente às restantes enzimas pertencentes a esta classe, a endonuclease III contém um agregado [4Fe-4S] que é facilmente convertido num agregado do tipo [3Fe-4S].⁹⁷

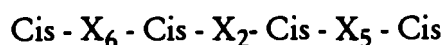
No estado nativo a enzima apresenta uma coloração acastanhada. O espectro óptico da endonuclease III é característico de uma proteína de ferro-enxofre com um pico de absorção máxima a 280 nm e uma banda alargada entre 400 e 350 nm.

A espectroscopia de Mössbauer da forma nativa indica que neste estado a proteína contém um agregado ferro-enxofre [4Fe-4S] na forma oxidada com um $\Delta E_Q = 1.18 \pm 0.02$ mm/s e um $\delta = 0.44 \pm 0.01$ mm/s, característicos da maioria dos agregados deste tipo (Tabela II.4). O espectro consiste num dobleto de quadrupolo com picos finos (largura de linha igual a 0.27 mm/s), indicando que os quatro átomos de ferro têm o mesmo ambiente à volta da sua esfera de coordenação. Contrariamente à aconitase e à generalidade dos agregados [4Fe-4S], o desdobramento de quadrupolo não é dependente da temperatura.⁹⁸

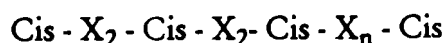
A presença de um agregado Fe-S na endonuclease III é também evidenciada pela espectroscopia de RPE. O espectro da enzima nativa mostra um sinal de muito baixa intensidade centrado a $g=2.01$, típico de um agregado $[3Fe-4S]$ no estado oxidado. A oxidação da amostra com ferricianeto de potássio produz um aumento significativo (~ 5 vezes maior) deste sinal, atribuído à conversão da forma $[4Fe-4S]^{2+}$ na forma $[3Fe-4S]^{1+}$ por perda de um átomo de ferro.

A foto-redução da amostra nativa implica uma diminuição da absorção global do espectro de visível sugerindo a redução total do agregado. O espectro de RPE mostra um sinal rômboico do tipo " $g=1.94$ ", com valores de g iguais a 2.04, 1.92 e 1.88 característico de um agregado $[4Fe-4S]^{1+}$ ($S=1/2$), que contabiliza 0.1-0.15 spin/4Fe. O facto da foto-redução originar a perda total da absorção no espectro de visível e apenas ser detectado cerca de 0.1 spin/4Fe no espectro de RPE pode dever-se à presença de outra(s) espécie(s) não detectadas por RPE. De facto, foram já descritos casos nos quais a maioria do agregado co-existe em diferentes estados de spin $S \geq 1/2$ ($S=3/2$, $S=5/2$).⁷³ O estado $S=3/2$ dos agregados $[4Fe-4S]^{1+}$ é normalmente caracterizado por bandas largas de baixa intensidade, situadas a campo baixo, entre $g=6$ e $g=4$. O uso de amostras não muito concentradas dificulta a visualização de tais bandas, nada se podendo concluir do espectro de RPE. No entanto, poder-se-à dizer que no estado reduzido, o agregado $[4Fe-4S]$ se encontra predominantemente no estado de spin $S > 1/2$.

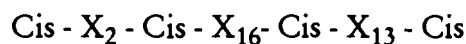
A estrutura cristalina de Raios-X da endonuclease III foi já determinada e revela um novo padrão de ligação dos ácidos aminados que coordenam os átomos de ferro do agregado.⁹⁹ Os resíduos de cisteína ligandos do agregado Fe-S estão localizados na região C-terminal apresentando o espaçamento seguinte:



Esta sequência contrasta com o padrão normal de ligação num agregado $[4Fe-4S]$, que no caso da maioria das ferredoxinas apresenta a seguinte sequência:^{2,68}



ou no caso das proteínas HiPIP onde os ligandos se encontram muito mais dispersos na estrutura primária:



Por outro lado a estrutura confirma os dados obtidos pela espectroscopia de Raman quanto à posição do agregado. O agregado de Fe-S encontra-se localizado numa posição espacialmente distante do sítio de ligação do DNA e não está directamente envolvido na ligação do substrato ou na catálise.^{100,101}

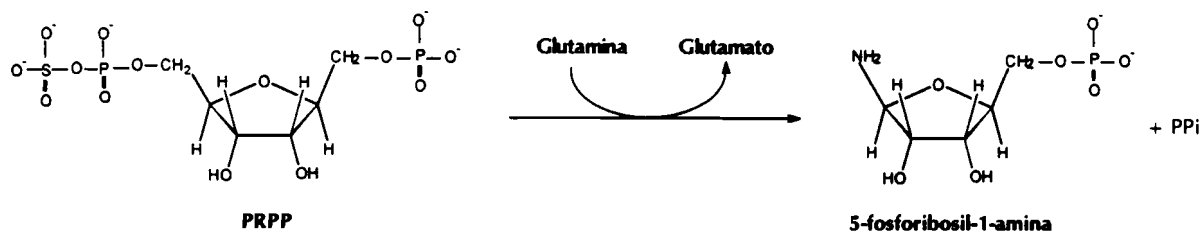
A não participação do agregado [4Fe-4S] da endonuclease III na catálise é apoiada pela ausência de alterações no espectro de Mössbauer de amostras reagidas com timina glicol, um inibidor da actividade de *N*-glicosilase.⁹⁸

Dado que a sequência da endonuclease III apresenta homologia com outra enzima com a mesma função mas que não possui qualquer agregado Fe-S, a glicosilase MutY da adenosina, Kuo e colaboradores sugerem que a endonuclease III constitui um protótipo desta nova classe de enzimas. A endonuclease III parece ser uma enzima essencial para a manutenção da integridade genética e biológica da célula, na medida em que está presente numa grande diversidade de espécies com linhas evolutivas diferentes. Por outro lado, a sua capacidade de iniciar a reparação do DNA em zonas danificadas, que de outro modo poderiam causar lesões graves ou até a morte da célula, revela-se de extrema importância.

O papel do agregado Fe-S não é claro, mas poderá consistir na manutenção da estabilidade de uma determinada estrutura terciária, na qual são conservados vários resíduos de ácidos aminados básicos, que interactivam com o DNA. Comparativamente, o agregado assume um papel análogo ao do zinco nas chamadas proteínas "zinc fingers", onde também não ocorre interacção entre o metal e o substrato.^{99,101}

II.4.3. A amidotransferase da glutamina 5-fosforibosil-1-pirofosfato

Outra enzima que possui um agregado [4Fe-4S] e que catalisa uma reacção não-redox é a amidotransferase da glutamina 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP). A amidotransferase da glutamina PRPP é uma enzima envolvida na biossíntese de nucleotídeos purínicos que catalisa a seguinte reacção:^{102,103}



As enzimas isoladas de células humanas e de *Bacillus subtilis* contêm um agregado [4Fe-4S] cuja integridade é essencial para a actividade enzimática. A destruição do agregado por reacção com oxigénio ou o-fenantrolina resulta na perda total da actividade.¹⁰² No entanto, a enzima é muito estável na ausência de oxigénio e, na forma activa, apresenta o agregado Fe-S no estado diamagnético com características físico-químicas típicas.

Contrariamente à aconitase ou à ferredoxina I de *D. gigas*, apenas uma pequena fracção do agregado $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ da amidotransferase da glutamina PRPP é convertida na forma paramagnética $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$.¹⁰³ Pensa-se que esta característica esteja associada ao facto do agregado ser particularmente resistente à redução. A redução da amidotransferase apenas foi conseguida por foto-redução com deazaflavina na presença de oxalato. O potencial de oxidação-redução não foi determinado com precisão, mas foi obtido um valor à volta de -620 mV.¹⁰³ O facto do espectro de RPE da enzima no estado reduzido não apresentar o sinal característico de um agregado Fe-S na forma $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$, foi explicado em termos da presença de espécies com $S > 1/2$, tal como na endonuclease III de *E. coli*. Este resultado foi, mais tarde, confirmado por estudos de Dicroísmo Circular Magnético que indicam que, em soluções diluídas da amidotransferase da glutamina PRPP, o agregado $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ se encontra estabilizado num estado de spin $S = 3/2$. Foi também observado que, em amostras

muito concentradas, o espectro de RPE é caracterizado por uma espécie paramagnética com estado de spin $S=5/2$.¹⁰⁴

A adição do substrato à amidotransferase da glutamina PRPP, seguida por congelação rápida e pela espectroscopia de Mössbauer, não produz qualquer alteração no espectro da enzima nativa. Estes resultados evidenciam a não interacção do substrato com o agregado Fe-S, sugerindo que este não está directamente envolvido na catálise da amidotransferase.

Devido ao facto do agregado [4Fe-4S] da amidotransferase da glutamina PRPP ser sensível ao oxigénio (tal como muitos agregados deste tipo encontrados em proteínas isoladas de bactérias anaeróbicas) foi sugerido que o agregado Fe-S é necessário para a manutenção da estrutura activa da enzima, através do controle dos mecanismos de inactivação e degradação proteolítica na presença de oxigénio.

II.4.4. Outras proteínas que contêm agregados [4Fe-4S] com função não-redox

Várias enzimas que catalisam reacções não-redox foram recentemente identificadas como pertencentes à classe das proteínas que contêm agregados Fe-S do tipo [4Fe-4S]. Neste grupo englobam-se: i) as fumarases A e B isoladas de *E. coli*. São enzimas que catalisam a interconversão do fumarato a L-malato, pela introdução de uma molécula de água. Geralmente as fumarases A e B são homodiméricas (2 x 60 kDa) sensíveis à temperatura.^{105,106} ii) desidratase da L-serina de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* que catalisa a reacção de desaminação da L-serina ou da L-treonina com formação de piruvato e 2-oxobutirato, respectivamente. Chamam-se desidratases pelo facto do primeiro passo da reacção que catalisam ser uma β -eliminação de uma molécula de água. Constituem uma nova família de enzimas desta classe por não conter fosfatopiridoxal como grupo prostético, o que poderá implicar um mecanismo reaccional diferente.^{42,107} iii) hidratase do ácido maleico, que catalisa a reacção de hidratação do ácido maleico a D-malato na presença de iões cloreto.³⁷ iv) desidratase do di-hidroxiácido isolada de *E. coli*, que catalisa o terceiro passo da via biossintética dos ácidos aminados ramificados.⁴¹ No estado nativo contém um

agregado [4Fe-4S], contrariamente à enzima análoga isolada de espinafres a qual possui um agregado binuclear do tipo [2Fe-2S]. O estado reduzido existe como uma mistura de espécies com diferentes estados de spin ($S=1/2$, $S=3/2$ e $S=5/2$), cuja espécie predominante corresponde ao estado com $S=3/2$, tal como o observado anteriormente em duas ferredoxinas.^{33,108} v) desidratase do L-(+)-tartrato purificada de *Pseudomonas putida* catalisa a conversão de L-(+)-tartrato a oxaloacetato com libertação de água.³⁶ E vi) três enzimas di-hidratases de hidroxilacil-CoA bacterianas dependentes de flavina, cuja mecanismo reaccional é idêntico (di-hidratase do lactil-CoA, desidratase do 2-hidroxibutiril-CoA e desidratase do 4-hidroxibutiril-CoA).^{40,109,110}

A ocorrência de agregados Fe-S do tipo [4Fe-4S] parece, assim, constituir um fenómeno comum nas proteínas que catalisam reacções de hidratação/desidratação, embora a estabilidade e o processo de activação destas enzimas varie nos diferentes casos. Normalmente a activação faz-se em condições redutoras na presença de iões ferrosos e grupos α -hidroxil, tal como na aconitase. Todos os mecanismos reaccionais propostos para estas enzimas são idênticos aos da aconitase, em que o grupo hidroxilo do substrato se torna um ligando do átomo de ferro lábil do agregado sendo activado para a posterior eliminação. O agregado ferro-enxofre actua assim, como ácido de Lewis, isto é, tem a capacidade de aceitar um par de electrões de uma base partilhando, com ela, uma ligação covalente.

II.5. Alguns aspectos evolutivos dos centros ferro-enxofre

O conhecimento sobre as proteínas de ferro-enxofre não tem parado de expandir durante os últimos 20 anos. O desenvolvimento de técnicas sofisticadas, tais como as espectroscopias de RPE, RMN e Mössbauer, a cristalografia de Raios-X, e também a interdisciplinaridade entre bioquímicos, químicos e físicos contribuiu para a aquisição de informação neste campo. Desta associação resultou a constatação de que as proteínas de Fe-S se encontram largamente distribuídas na natureza e são de uma importância vital para a célula.

A possibilidade de incorporação de outros metais (que não ferro) nos agregados, a presença de agregados com estados de spin não usuais, assim como o aparecimento de centros Fe-S com funções não-redox, é controlada pela estrutura e enrolamento da cadeia polipeptídica. A análise das estruturas primárias e secundárias de diferentes proteínas pertencentes à mesma classe (ou não) permitiu considerar aspectos evolutivos destas proteínas e consequentemente tentar correlacionar a estrutura com a sua função. É lícito assumir que proteínas de Fe-S com a mesma função, ou origem, apresentem um elevado grau de homologia das suas estruturas primárias. Normalmente, as partes mais conservadas em termos evolutivos, são as que envolvem os resíduos de cisteína que estão ligados ao agregado.

As ferredoxinas são proteínas de ferro-enzofre relativamente simples que estão presentes em quase todos os organismos. Devido à sua baixa massa molecular (~6-12 kDa), é possível determinar a sequência total dos ácidos aminados da cadeia polipeptídica seguindo metodologias mais acessíveis. Actualmente, são conhecidas quase cem sequências completas de Fds isoladas de vários organismos e cerca de dez estruturas terciárias estabelecidas por cristalografia de Raios-X.^{29,33,111}

Da comparação das diferentes sequências verificou-se que existem vários padrões de ligação ao agregado Fe-S comuns à mesma família de proteínas. De entre as ferredoxinas que contêm agregados do tipo [2Fe-2S] podem distinguir-se três ou quatro famílias distintas. A principal engloba as que foram isoladas de algas e plantas que, do ponto de vista filogenético não estão relacionadas com as Fd isoladas de halobactérias. As ferredoxinas que possuem quatro átomos de ferro dividem-se em duas famílias: as proteínas HiPIP que ocorrem nas bactérias fotossintéticas e em *Paracoccus denitrificans* e as restantes, que apresentam potenciais de oxidação-redução mais baixos. Nesta última família incluem-se todas as Fd que contêm um ou dois agregados [4Fe-4S] e, em alguns casos, as que possuem um agregado de [4Fe-4S] e um do tipo [3Fe-4S]. Exemplos típicos são: a Fd de *P. aerogenes* (dois agregados [4Fe-4S]), a Fd de *Bacillus stearothermophilus* (um agregado [4Fe-4S]) e a Fd I de *Az. vinelandii* (contém um agregado [4Fe-4S] e um de [3Fe-4S]).⁶⁸

A família das ferredoxinas com agregados [4Fe-4S] é particularmente interessante dado que os agregados [4Fe-4S] ocorrem em todas as formas de vida. Encontram-se frequentemente em proteínas com estruturas mais complexas, associados com outros grupos prostéticos. Foram já determinadas cerca de cinquenta sequências de proteínas pertencentes a esta família. Apesar da sua diversidade, pensa-se que todas estas proteínas tenham evoluído de um ancestral comum. A forma ancestral seria constituída por uma única cadeia polipeptídica de vinte e seis ácidos aminados que, por um processo de duplicação de genes teria originado um transportador electrónico activo. Existem evidências que por uma segunda duplicação de genes tenha sido produzida uma forma semelhante às presentes Fd com dois átomos de ferro.^{29,123,112}

O processo evolutivo mais provável das ferredoxinas bacterianas, baseado nas suas estruturas primária e terciária, parece ter passado por vários processos de duplicação e de deleção a partir de uma única forma básica.^{29,33} A forma básica de duplicação dos genes do ancestral é conservada na sequência das ferredoxinas isoladas do género *Clostridium*, que sofreram várias alterações no decurso da evolução. Alguns membros desta família terão sofrido deleções e consequentemente perdido um dos agregados [4Fe-4S] que terá sido substituído por um agregado [3Fe-4S]. Esta hipótese é apoiada pelo facto de existir um quarto resíduo de cisteína na proximidade das cisteínas que ligam ao agregado [3Fe-4S]. Outras alterações terão ocorrido originando a grande diversidade de ferredoxinas e de proteínas com elas relacionadas. Agregados com novas estruturas e geometrias terão aparecido resultantes de mutações várias ao longo do processo evolutivo.

Tabela II.2

Propriedades bioquímicas de algumas proteínas de ferro-enxofre

Proteína	M. M. (kDa)	Centros Fe-S	Outros cofactores	Potencial redox (mV)	Função	Ref.
Centro FeCis₄						
Rubredoxina (<i>Desulfovibrio</i> sp.)	~ 6.0	1	—	+6 (pH=8.4)	Transferência electrónica	8,10, 113,114
Desulforedoxina (<i>D. gigas</i>)	2 x 4.0	2	—	-35 (pH=8.0)	Transferência electrónica (?)	15,115
Desulfoferrodoxina (<i>D. desulfuricans</i>)	14.0	1	Fe	+4 (pH=7.6)	(?)	16,116
Agregado Fe₂S₂Cis₂						
Ferredoxina (Salsa)	~ 12.0	1	—	-416 (pH=7.9)	Transporte electrónico	68
Oxido-redutase do aldeído (<i>D. gigas</i>)	96.0	2	Pterina de Mo	-280, -285 (pH=7.6)	$R-CHO + D_{ox} \longrightarrow$ $\longrightarrow R-COO^- + D_{red}$	117,118
Ferroquelatase (Fígado de rato)	42.0	1	—	—	Passo final da biossíntese do grupo hemo (inserção do ferro em porfirinas)	119,120
Agregado "Rieske"						
Proteína "Rieske" (<i>T. thermophilus</i>)	~ 20.0	2	—	+140 (pH=7.5)	Transporte electrónico	18
Putidamonoxina (<i>P. putida</i>)	3 x 41	1	Fe	—	Componente da demetilase do 4-metoxibenzoato	121
Dioxigenase do benzeno (<i>P. putida</i>)	23.5 + 54.5	1	Fe	-112 (pH=7.0)	$Benzeno + NADH + O_2 \longrightarrow$ $\longrightarrow Cis-Benzenoglicol + NAD^+$	122

Tabela II.2 (continuação)
Propriedades bioquímicas de algumas proteínas de ferro-enzofre

Proteína	M. M. (kDa)	Centros Fe-S	Outros cofactores	Potencial redox (mV)	Função	Ref.
Agregado [4Fe-4S]						
Ferredoxina I (<i>D. gigas</i>)	~ 6.0	1	—	-450 (pH=7.6)	Transferência electrónica	123
Redutase do sulfito assimilativa (<i>E. coli</i>)	8 x 59 + 4 x 55	4	sirohemio 4 x FMN 4 x FAD	—	Redução directa do sulfito a sulfureto	124
Redutase do sulfito assimilativa (<i>D. vulgaris</i>)	27.0	1	sirohemio	—	Redução directa do sulfito a sulfureto	125
Redutase do sulfito dissimilativa (<i>D. gigas</i>)	2 x 50 + 2 x 40 + 2 x 11	4	Sirohemio + Fe (?)	—	Redução da molécula de sulfito	126
Hidrogenase de ferro (<i>D. vulgaris</i>)	45.8 + 10.0	2	agregado H	-350 (pH=7.0)	$2\text{H}^+ + 2e^- \leftrightarrow \text{H}_2$	127
Proteína de ferro da nitrogenase (<i>Az. vinelandii</i>)	2 x 60	1	MgATP	-300	Transferência electrónica (Redução da proteína FeMo)	128
Endonuclease III (<i>E. coli</i>)	24.0	1	—	—	Endonuclease AP	97
Amidotransferase da glutamina PRPP (<i>B. subtilis</i>)	4 x 50	1	—	-600 (pH=8.0)	Glutamina + PRPP → → 5-PR-1-Amina + Glutamato + PPi	103
Agregado [3Fe-4S]						
Ferredoxina II (<i>D. gigas</i>)	~ 6.0	1	—	-130 (pH=8.0)	Transferência electrónica	46
Ferredoxina I (<i>Az. vinelandii</i>)	12.7	1	[4Fe-4S]	-460 (pH>8)	Transferência electrónica	31,44
Aconitase (mitocôndrias, bactérias)	~ 81	1	—	—	Citrato ↔ Isocitrato Nota: A forma activa da enzima contém um agregado [4Fe-4S]	33

Tabela II.3

Propriedades espectroscópicas de algumas proteínas de ferro-enxofre

Proteína	Espectroscopia de UV/visível	Espectroscopia de RPE		Ref.
	Máximos de absorção (nm)	Valores de g	<i>g</i> médio	
Centro FeCis₄ (estado oxidado, 3 +)				
Rubredoxina (<i>D. gigas</i>)	493, 376, 278	9.4, 4.61, 4.27, 4.02	—	129
Desulforedoxina (<i>D. gigas</i>)	507, 370, 278	7.7, 5.7, 4.1	—	15,115
Desulfoferredoxina (<i>D. desulfuricans</i>)	495, 368, 279 (forma rosa)	7.7, 5.7, 4.3, 1.8	—	16,116
Agregado Fe₂S₂Cis₂ (estado oxidado, 2 +) / (estado reduzido, 1 +)				
Ferredoxina (Salsa)	460, 422, 328, 275	2.05, 1.96, 1.90	1.970	18,70
Oxido-redutase do aldeído (<i>D. gigas</i>)	462, 415, 323, 280	2.02, 1.94, 1.92 2.06, 1.97, 1.90	1.959 1.976	117,130
Ferroquelatase (Fígado de rato)	550 ^① , 460 ^① , 330, 280	2.00, 1.93, 1.90	1.943	119,120
Agregado "Rieske" (estado oxidado, 2 +) / (estado reduzido, 1 +)				
Proteína "Rieske" (<i>T. thermophilus</i>)	560 ^① , 458, 330	2.02, 1.90, 1.80	1.907	18,131
Putidamonoxina (<i>P. putida</i>)	570 ^① , 455	2.01, 1.91, 1.78	1.900	121
Dioxigenase do benzeno (<i>P. putida</i>)	560 ^① , 460, 340	2.02, 1.97, 1.75	1.896	132,133

Tabela II.3 (continuação)

Propriedades espectroscópicas de algumas proteínas de ferro-enxofre

Proteína	Espectroscopia de UV/visível	Espectroscopia de RPE		Ref.
	Máximos de absorção (nm)	Valores de g	<i>g</i> médio	
Agregado [4Fe-4S] (estado oxidado, 2+) / (estado reduzido, 1+)				
Ferredoxina I (<i>D. gigas</i>)	405, 300	2.07, 1.94, 1.91	1.973	123
Redutase do sulfito assimilativa (<i>E. coli</i>)	714, 587, 455, 280	2.04, 1.93, 1.91	1.960	134,135
Redutase do sulfito dissimilativa (<i>D. gigas</i>)	714, 627, 580, 410, 390	2.08, 1.93, 1.90 ^② 2.05, 1.93, 1.86 ^②	1.970 1.947	136
Hidrogenase de ferro (<i>D. vulgaris</i>)	~ 400	2.05, 2.015, 1.94, 1.90 (sinal de interação)	—	137
Aconitase (coração de boi)	~ 400	2.06, 1.93, 1.86 2.04, 1.85, 1.78 (+ substrato)	1.950 1.890	33
Endonuclease III (<i>E. coli</i>)	410 ^① , 280	2.04, 1.92, 1.88	1.947	97,98
Amidotransferase da glutamina PRPP (<i>B. subtilis</i>)	~ 490	2.04, 1.94, 1.90	1.950	102
Agregado [3Fe-4S] (estado oxidado, 1+)				
Ferredoxina II (<i>D. gigas</i>)	453 ^① , 415, 305	2.02, 2.00, 1.97 12 (estado reduzido, 0)	1.907	46,73
Ferredoxina I (<i>Az. vinelandii</i>)	~ 400	2.01	—	44
Aconitase (coração de boi)	~ 400	2.01	—	77

① Representa um ombro

② Detectados na presença de S²⁻ ou CN⁻

Tabela II.4

Parâmetros usados na simulação dos espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enxofre

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp. K)	D (cm ⁻¹)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A			η (β)	Ref.
						A_x (g _x)	A_y (g _y)	A_z (g _z)		
Rubredoxina (<i>C. pasteurianum</i>)	Fe ³⁺	1.9	0.23	-0.50	0.32	-165 (2.0)	-159 (2.0)	-169 (2.0)	0.2	138
	Fe ²⁺	—	—	3.27	0.71	—	—	—	—	
Agregado [4Fe-4S]										
Ferredoxina I (<i>D. gigas</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	0.56 (25%) 1.37 (75%)	0.40 (25%) 0.45 (75%)	—	—	—	—	49
Ferredoxina (<i>B. stearothermophilus</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	1.50 1.20 1.10 0.66	0.42 0.43 0.42 0.42	—	—	—	0.8	72
	1+ (4.2 K)	—	—	1.32 1.89	0.50 0.58	-232 19	-238 98	-2.04 63	0.78 0.32	
Ferredoxina (<i>C. pasteurianum</i>)	1+ (4.2 K)	—	—	1.70 1.05	0.55 0.50	90 -112	40 -112	27 -85	0.5 0.5	72
Hidrogenase (<i>D. gigas</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	1.32 1.33 1.00 0.74	0.44 0.43 0.44 0.41	—	—	—	0.8 0.8 0.65 0.65	139
	1+ (4.2 K)	Agregado I →		1.0 1.3	0.50 0.55	30 -180	30 -220	30 -250	0.3 -0.2	
		Agregado II →		1.5 -1.2	0.50 0.43	82 -280	83 -210	83 -50	1.2 1.3	
Redutase do sulfito (<i>D. gigas</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	1.45 1.10 1.10 0.72	0.45 0.45 0.45 0.41	—	—	—	0.8 0.8 0.65 0.65	126
	1+ (4.2 K)	—	—	0.72 1.93	0.50 0.62	-234 139	-248 161	0.0 0.0	0.3 -0.2	

Tabela II.4 (continuação)

Parâmetros usados na simulação dos espectros de Mössbauer de proteínas de ferro-enzofre

Proteína (Organismo)	Estado de oxidação (Temp K)	D (cm ⁻¹)	E/D	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A			η (β)	Ref.
						A_x (g _x)	A_y (g _y)	A_z (g _z)		
Endonuclease III (<i>E. coli</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	1.18	0.44	—	—	—	0.5	98
Aconitase (Coração de boi)	1+ (4.2 K)	—	—	1.15	0.49	-285	-285	-234	0.0	81
				-2.6	0.64	88	88	161	0.0	
				+2.6	1.00	248	248	190	0.0	
	2+ (4.2 K)	—	—	1.34 (75%)	0.46 (75%)	—	—	—	—	—
				0.81 (25%)	0.45 (25%)	—	—	—	—	—
Amidotransferase da glutamina PRPP (<i>B. subtilis</i>)	2+ (4.2 K)	—	—	1.17	0.45	—	—	—	0.7	102
HiPIP (<i>C. vinosum</i>)	3+ (4.2 K)	—	—	0.96	0.35	—	—	—	—	140
	2+ (4.2 K)	—	—	1.14	0.43	—	—	—	—	72
				1.12	0.43	—	—	—	—	
	1+ (4.2 K)	—	—	1.61	0.54	—	—	—	—	
Agregado [3Fe-4S]										
Ferredoxina II (<i>D. gigas</i>)	1+ (15 K)	—	—	0.54	0.27	-197	-321	-321	1.0	46
				0.54	0.27	211	117	117	1.0	114
				0.54	0.27	26	26	26	1.0	
	0+ (4.2 K) (10 K)	2.5	0.22	1.47 (66%)	0.46 (66%)	-160	-120	-120	0.4 (20)	73 114
				-0.47 (33%)	0.30 (33%)	70	130	127	-2.0 (15)	
Ferredoxina II (<i>Az. vinelandii</i>)	1+ (4.2 K)	—	—	0.63	0.27	-270	-306	-328	0.7	44
				0.63	0.27	124	124	124	0.7	
				~ 0.6	~ 0.3	~ 4	~ 4	~ 4		
					-0.4					

II.6. Bibliografia

1. Wächtershäuser, G. 1992. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **58**, 85-201.
2. Beinert, H. 1990. *FASEB J.* **4**, 2483-2491.
3. Cammack, R. 1991. *Adv. Inorg. Chem.* **38**, 1-470.
4. Kim, J., e Rees, D.C. 1992. *Nature* **360**, 553-560.
5. George, G.N., Prince, R.C., Stokley, K.E., e Adams, M.W.W. 1989. *Biochem. J.* **259**, 597-600.
6. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M.Y., e LeGall, J. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 4489-4496.
7. Pierik, A.J., Hagen, W.R., Dunham, W.R., e Sands, R.H. 1992. *Eur. J. Biochem.* **206**, 705-719.
8. LeGall, J., e Peck, H.D., Jr. 1987. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 35-40.
9. LeGall, J., Fauque, G. 1988. In "Biology of Anaerobic microorganisms", Ed. A.J.B. Zehnder, págs. 587-639, Wiley, New York.
10. Papavassiliou, P., e Hatchikian, E.C. 1985. *Biochim. Biophys. Acta* **810**, 1-11.
11. Lovenberg, W., e Sobel, B.E. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 193-199.
12. LeGall, J. 1968. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **114**, 109-115.
13. Lode, E.T., e Coon, M.J. 1971. *J. Biol. Chem.* **246**, 791-802.
14. LeGall, J., Prickril, B.C., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. 1988. *Biochem.* **27**, 1636-1642.
15. Moura, I., Bruschi, M., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 1037-1044.
16. Moura, I., Tavares, P., Moura, J.J.G., Ravi, N., Huynh, B.H., Liu, M., LeGall, J. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 21596-21602.

17. Tavares, P., Moura, J.J.G., LeGall, J., Huynh, B.H., e Moura, I. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**, 10504-10510.
18. Fee, J.A., e Palmer, G. 1971. *Biochim. Biophys. Acta* **245**, 175-195.
19. Grabau, C., Schatt, E., Jouanneau, Y., Vignais, P.M. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**, 3294-3299.
20. Rypniewski, W.R., Breiter, D.R., Benning, M.M., Wesenberg, G., Oh, B.H., Markley, J.L., Rayment, I., e Holden, H.M. 1991. *Biochem.* **30**, 4126-4131.
21. Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, H. 1980. *Nature* **286**, 522.
22. Tsukihara, T., Fukuyama, K., Mizashima, M., Harioka, T., Kusonaki, M., Katsube, Y., Hase, T., e Matsubara, H. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 399-410.
23. Masaki, R., Yoshikawa, S., e Matsubara, H. 1982. *Biochim. Biophys. Acta* **700**, 101-109.
24. Ida, S. 1977. *Biochem.* **82**, 915-918.
25. Lea, P.J., e Mifflin, B.J. 1974. *Nature* **251**, 614-616.
26. Bertrand, P., Guigliarelli, B., e More, C. 1991. *New J. Chem.* **15**, 445-454.
27. Edwards, C.A., Bowyer, J.R., e Trumpower, B.L. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**, 3705-3713.
28. Beinert, H., e Thomson, A.J. 1983. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 333-361.
29. Fukuyama, K., Nagara, Y., Tsukihara, T., e Katsube, Y. 1988. *J. Mol. Biol.* **199**, 183-193.
30. Lim, L.W., Shamala, N., Mathews, S., Steenkamp, D.J., Hamlin, R., e Xuong, N.H. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**, 15140-15146.
31. Stout, G.H., Turley, S., Sieker, L.C., e Jensen, L.H. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1020-1022.
32. Kuo, C.-F., McRee, D.E., Fisher, C.L., O'Handley, S.F., Cunningham, R.P., e Tainer, J.A. 1992. *Science* **258**, 434-440.

33. Conover, R.C., Kowal, A.T., Fu, W., Park, J.-B., Aono, A., Adams, M.W.W., e Johnson, M.K. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**, 8533-8541.
34. Beinert, H., e Kennedy, M.C. 1989. *Eur. J. Biochem.* **186**, 5-15.
35. Kuchta, R.D., Hanson, G.R., Holmquist, B., e Abeles, R.H. 1986. *Biochem.* **25**, 7301-7307.
36. Kelly, J.M., e Scopes, R.K. 1986. *FEBS Lett.* **202**, 274-276.
37. Dreyer, J.-L. 1985. *Eur. J. Biochem.* **150**, 145-154.
38. Emptage, M.H. 1988. *Biochem.* **27**, 3104.
39. Alam, J., Whitaker, R.A., Krogmann, D.W., e Curtis, S.E. 1986. *J. Bacteriol.* **168**, 1265.
40. Schweiger, G., Dutscho, R., e Buckel, W. 1987. *Eur. J. Biochem.* **169**, 441-448.
41. Flint, D.H., Emptage, M.H., Finnegan, M.G., Fu, W., e Johnson, M.K. 1993. *J. Biol. Chem.* **268**, 14732-14742.
42. Grabowski, R., Hofmeister, A.E.M., e Buckel, W. 1993. *Trends Inorg. Biochem. Soc.* **18**, 297-300.
43. Spiro, S., e Guest, J.R. 1990. *FEMS Microbiol. Lett.* **75**, 399.
44. Emptage, M.K., Kent, T.A., Huynh, B.H., Rawlinhgs, J., Orme-Johnson, W.H, e Münck, E. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**, 1793-1796.
45. Kent, T.A., Dreyer, J.L., Kennedy, M.C., Huynh, B.H., Emptage, M.H., Beinert, H., e Münck, E. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1096-1100.
46. Huynh, B.H., Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**, 3242-3244.
47. Kissinger, C.R., Sieker, L.C., Adman, E.T., e Jensen, L.H. 1991. *J. Mol. Biol.* **219**, 693.
48. Arendsen, A.F., Schalk, J., e Hagen, W.R. 1994. *J. Inorg. Biochem*, em impressão.

49. Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., Lipscomb, J.D., Huynh, B.H., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. *J. Biol. Chem.* **257**, 6259-6267.
50. Moura, I., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. 1983. *In* "Mobility and Recognition in Cell Biology" Ed. Sund, Veeger, págs. 83-101.
51. Moura, I., Moura, J.J.G., Münck, E., Papaefthymiou, V., e LeGall, J. 1986. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 349-351.
52. Surerus, K.K., Münck, E., Moura, I., Moura, J.J.G., LeGall, J. 1987. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3805-3807.
53. Moura, J.J.G., Macedo, A.L., Moreno, C., e Moura, I. 1992. *In* "Supramolecular Chemistry" Ed. V. Balzani, e L. De Cola, págs. 403-410.
54. Fu, W., Telser, J., Hoffman, B.M., Smith, E.T., Adams, M.W.W., Finnegan, M.C., Conover, R.C., e Johnson, M.K. 1994. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5722-5729.
55. Shal, V.K., e Brill, W.J. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.
56. Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J., e Rees, D.C. 1992. *Science* **257**, 1653-1659.
57. Hagen, W.R., Van Berkel-Arts, A., Krüse-Wolters, K.M., Dunham, W.R., e Veeger, C. 1986. *FEBS Lett.* **203**, 59-63.
58. Huynh, B.H., Czechowski, M.H., Krüger, H.-J., DerVartanian, D.V., Peck, H.D. Jr., e LeGall, J. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3728.
59. Huynh, B.H. 1994. *Methods Enzimology* **243**, em impressão.
60. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Huynh, H.B., e Moura, J.J.G. 1990. *Eur. J. Biochem.* **188**, 653-664.
61. Fu, W., Drozdezewski, P.M., Morgan, T.V., Mortenson, L.E., Juszczak, A., Adams, M.W.W., He, S.-H., Peck, H.D., Jr., DerVartanian, D.V., LeGall, J., e Johnson, M.K. 1993. *Biochem.* **32**, 4813-4819.

62. Pierik, A.J., Wolbert, B.G., Mutsaers, P., Hagen, W.R., e Veeger, C. 1992. *Eur. J. Biochem.* **206**, 697-704.
63. Pierik, A.J., e Hagen, W.R. 1991. *Eur. J. Biochem.* **195**, 505-516.
64. Jetten, M.S.M., Hagen, W.R., Pierik, A.J., Stams, A.J.M., e Zehnder, A.J.B. 1991. *Eur. J. Biochem.* **195**, 385-391.
65. Verhagen, M.F.J.M., Kooter, I.M., Wolbert, R.B.G., e Hagen, W.R. 1994. *Eur. J. Biochem.* **221**, 831-837.
66. Xavier, A.V., Moura, J.J.G., e Moura, I. 1981. *Struc. Bond.* **43**, 187-213.
67. Moura, I., Macedo, A., e Moura, J.J.G. 1989. In "Advanced EPR - Application in Biology and Biochemistry", Ed. A.J. Hoff, Cap. 23, págs. 813-838. Elsevier Publ. Cy., Amsterdam.
68. Cammack, R., Rao, K.K., Barger, C.P., Hutson, K.G., Andrew, P.W., e Rogers, L.J. 1977. *Biochem. J.* **168**, 205-209.
69. Palmer, G., Brintzinger, H., e Eatabrook, R.W. 1967. *Biochem.* **6**, 1658-1664.
70. Sands, R.H., e Dunham, W.R. 1975. *Quarterly Rev. Biophys.* **7**, 443-504.
71. Flatmark, T., e Dus, K. 1969. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 377-387.
72. Middleton, P., Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., e Rush, J. 1978. *Eur. J. Biochem.* **88**, 135-141.
73. Papefthymiou, V., Gired, J.-J., Moura, I., Moura, J.J.G., e Münck, E. 1987. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 4703-4710.
74. Kent, T.A., Huynh, B.H., e Münck, E. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6574-6576.
75. Tavares, P., Caldeira, J., Pereira, A.S., Moura, I., e Moura, J.J.G. 1994. *Boletim Biotecnologia* **47**, 11-24.
76. Prodromou, C., Artymiuk, P.J., e Guest, J.R. 1992. *Eur. J. Biochem.* **204**, 599-609.

77. Kennedy, M.C., Kent, T.A., Emptage, M., Merkle, H., Beinert, H., e Münck, E. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 14463-14471.
78. Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Dreyer, J.-L., e Beinert, H. 1983. *J. Biol. Chem.* **258**, 11098-11105.
79. Emptage, M.H., Dreyer, J.-L., Kennedy, M.C., e Beinert, H. 1983. *J. Biol. Chem.* **258**, 11106-11111.
80. Emptage, M.H., Kent, T.A., Kennedy, M.C., Beinert, H., e Münck, E. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4674-4678.
81. Kent, T.A., Emptage, M.H., Merkle, H., kennedy, M.C., beinert, H., e Münck, E. 1985. *J. Biol. Chem.* **260**, 6871-6881.
82. Werst, M.M., Kennedy, M.C., Houseman, A.L.P., Beinert, H., e Hoffman, B.M. 1990. *Biochem.* **29**, 10533-10540.
83. Lowe, D.J. 1992. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **57**, 1-58.
84. Werst, M.M., Kennedy, M.C., Beinert, H., e Hoffman, B.M. 1990. *Biochem.* **29**, 10526-10532.
85. Robbins, A.H., e Stout, C.D. 1989. *Proteins* **5**, 289-312.
86. Robbins, A.H., e Stout, C.D. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3639-3643.
87. Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., e Stout, C.D. 1992. *Biochem.* **31**, 2735-2748.
88. Emptage, M.H. 1988. In "Metal Clusters in Proteins", Ed. L. Que, Jr., págs. 343-369.
89. Klausner, R.D., Rouault, T.A., e Harford, J.B. 1993. *Cell* **72**, 19-28.
90. klausner, R.D., e Harford, J.B. 1989. *Science* **246**, 870-872.
91. Rouault, T.A., Stout, C.D., Kaptain S., Harford, J.B., e Klausner, R.D. 1991. *Cell* **64**, 881-883.
92. Kaptain, S., Downey, W.E., Tang, C., Philpott, C., Haile, D., Orloff, D.G., Harford, J.B., Rouault, T.A., e Klausner, R.D. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10109-10113.

93. Kennedy, M.C., Mende-Mueller, L., Blondin, G.A., e Beinert, H. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11730-11734.
94. Beinert, H. e Kennedy, M.C. 1993. *FASEB J.* **7**, 1442-1449.
95. Klausner, R.D., e Rouault, T.A. 1993. *Molec. Biol. Cell* **4**, 1-5.
96. Rouault, T.A., Haile, D.J., Downey, W.E., Philpott, C.C., Tang, C., Samaniego, F., Chin, J., Paul, I., Orloff, D., Harford, J.B., e Klausner, R.D. 1992. *BioMetals* **5**, 131-140.
97. Asahara, H., Wistort, P.M., Bank, J.F., Bakerian, R.H., e Cunningham, R.P. 1989. *Biochem.* **28**, 4444-4449.
98. Cunningham, R.P., Asahara, H., e Bank, J.F. 1989. *Biochem.* **28**, 4450-4455.
99. Kuo, C.-F., McRee, D.E., Fisher, C.L., O'handley, S.F., Cunningham, R.P., e Tainer, J.A. 1992. *Science* **258**, 434-440.
100. Fu, W., O'handley, S.F., Cunningham, R.P. e Johnson, M.K. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 16135-16137.
101. Prince, R.C., e Grossman, M.J. 1993. *Trends Inorg. Biochem. Soc.* **18**, 145-154.
102. Averill, B.A., Dwivedi, A., Debrunner, P., Vollmer, S.J., Wong, J.Y., e Switzer, R.L. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**, 6007-6010.
103. Vollmer, S.J., Switzer, R.L., e Debrunner, P. 1983. *J. Biol. Chem.* **258**, 14284-14293.
104. Onate, Y.A., Vollmer, S.J., Switzer, R.L., e Johnson, M.K. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 18386-18391.
105. Yumoto, N., e Tokushige, M. 1988. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1236-1243.
106. Bell, P.J., Andrews, S.C., Sivak, M.N., e Guest, J.R. 1989. *J. Bacteriol.* **171**, 3494-3503.
107. Grabowski, R., e Buckel, W. 1991. *Eur. J. Biochem.* **199**, 89-94.
108. Armstrong, F.A., George, S.J., Cammack, R., Hatchikian, E.C., e Thomson, A.J. 1989. *Biochem. J.* **264**, 265-273.

109. Buckel, W. 1992. *FEMS Microbiol. Rev.* **88**, 211-232.
110. Scherf, U., e Buckel, W. 1993. *Eur. J. Biochem.* 421-429
111. Bruschi, M., e Guerlesquin, F. 1988. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**, 155-176.
112. Otaka, E., e Ooi, T. 1989. *J. Mol. Evol.* **29**, 246-254.
113. Probst, I., Moura, J.J.G., Moura, I., Bruschi, M., e LeGall, J. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* **502**, 38-44.
114. Moura, I. 1980. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, U.N.L.
115. Moura, I., Xavier, A.V., Cammack, R., Bruschi, M., e LeGall, J. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 156-162.
116. Tavares, P. 1994. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, U.N.L.
117. Barata, B.A.S., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1993. *Biochem. J.* **32**, 11559-11568.
118. Turner, N. Barata, B., Bray, R.C., Deistrung, J., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1987. *Biochem. J.* **243**, 755-761.
119. Ferreira, G.C., Franco, R., Lloyd, S.G., Pereira, A.S., Moura, I., Moura, J.J.G., e Huynh, H.B. 1994. *J. Biol. Chem.* **269**, 7062-7065.
120. Dailey, H.A., Finnegan, M.G., e Johnson, M.K. 1994. *Biochem.* **33**, 403-407.
121. Bernhardt, F.-H. Heymann, E., e Traylor, P.S. 1978. *Eur. J. Biochem.* **92**, 209-223.
122. Ensley, B.D., Gibson, D.T. 1983. *J. Bacteriol.* **155**, 505-511.
123. Bruschi, M., Hatchiakian, C.E., LeGall, J., Moura, J.J.G., e Xavier, A.V. 1976. *Biochim. Biophys. Acta* **449**, 275-284.
124. Ostrowski, J.W., Wu, J.Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., e Kredich, N.M. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 15726-15735.
125. Huynh, H.B., Kang, L., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 15373-15376.

126. Moura, I., LeGall, J., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr., Fauque, G., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura, J.J.G., e Huynh, H.B. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 1075-1082.
127. Adams, M.W.W. 1990. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 115-145.
128. Dean, D.R., Bolin, J.T., e Zheng, L. 1993. *J. Bacteriol.* 175, 6737-6744.
129. Moura, I., Xavier, A.V., Cammack, R., Bruschi, M., e LeGall, J. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* 533, 156-162.
130. Bray, R.C., Turner, N.A., LeGall, J., Barata, B.A.S., e Moura, J.J.G. 1991. *Biochem. J.* 280, 817-820.
131. Fee, J.A., kuila, D., Mather, M.W., e Yoshida, T. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 853, 153-185.
132. Geary, P.J., Saboowalla, F., Paril, D., e Cammack, R. 1984. *Biochem. J.* 217, 667-673.
133. Fee, J.A., Findling, K.L., Yoshida, T., Hille, R., Tarr, G.E., Hearshen, D.O., Dunham, W.R., Day, E.P., Kent, T.A., e Münk, E. 1984. *J. Biol. Chem.* 259, 124-133.
134. Siegel, L.M., e Davis, P.S. 1974. *J. Biol. Chem.* 249, 1587-1586.
135. Siegel, L.M., Rueger, D.C., Barber, M.J., Krueger, R.J., Orme-Johnson, N.R., e Orme-Johnson, W.H. 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 6343-6350.
136. Lino, A.R. 1986. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências, U.L.
137. Patil, D.S., Moura, J.J.G., He, S.H., Teixeira, M., Prickril, B.C., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., e Huynh, H.B. 1988. *J. Biol. Chem.* 263, 18732-18738.
138. Schulz, C., e Debrunner, P.G. 1976. *J. Phys. (Paris) Colloq.* 37, 153-158.
139. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., Moura, J.J.G., e Huynh, H.B. 1983. *J. Biol. Chem.* 264, 16435-16450.
140. Middleton, P., Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., e Rush, J.D. 1980. *Eur. J. Biochem.* 104, 289-296.

CAPÍTULO III

AS REDUTASES DO APS ANTERIORMENTE DESCRITAS

III. As redutases do APS anteriormente descritas.

1. Introdução	99
2. As redutases do APS das bactérias redutoras de sulfato	102
3. As redutases do APS das bactérias do género <i>Thiobacillus</i>	106
4. As redutases do APS de bactérias fototróficas de enxofre	108
5. A redutase do APS da arqueobactéria <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	109
6. A formação de aducto entre a flavina da redutase do APS e o sulfito	110
7. O mecanismo da redutase do APS	111
8. Bibliografia	120

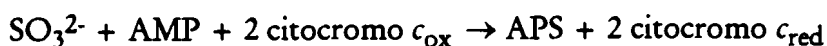
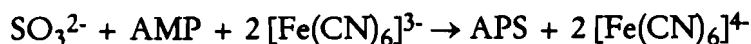
III.1. Introdução

A redutase do APS é, como foi referido no capítulo I, uma das três principais enzimas envolvidas na redução dissimilativa da molécula de sulfato. Primeiramente isolada da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans*, sabe-se hoje que a redutase está presente em todas as estirpes do género *Desulfovibrio* estudadas até à data, representando entre 1 a 3% da proteína total.^{1,2} Foi também purificada de algumas bactérias oxidantes de enxofre pertencentes ao género *Thiobacillus*, de uma arqueobactéria termofílica do género *Archaeoglobus*, e ainda de vários organismos fototróficos oxidantes de enxofre.^{3,4}

A redutase do APS catalisa a reacção reversível, geralmente representada pelo seguinte equilíbrio:



A detecção da enzima nos extractos celulares é efectuada através de ensaios de actividade enzimática seguindo ambos os sentidos da reacção. Na reacção directa de conversão de APS (Figura III.1) em AMP e sulfito é, normalmente, usado viologénio de metilo como dador de electrões, enquanto que na reacção inversa, é seguida a redução do ferricianeto de potássio ou do citocromo *c* na presença de oxigénio, de acordo com os seguintes mecanismos:^{5,6,7,8}



Normalmente, os estudos cinéticos são efectuados seguindo a reacção inversa usando ferricianeto de potássio como aceitador de electrões. Este método é usado por ter sido observado que a actividade enzimática, nestas condições, dependia da presença dos agregados ferro-enxofre.⁹

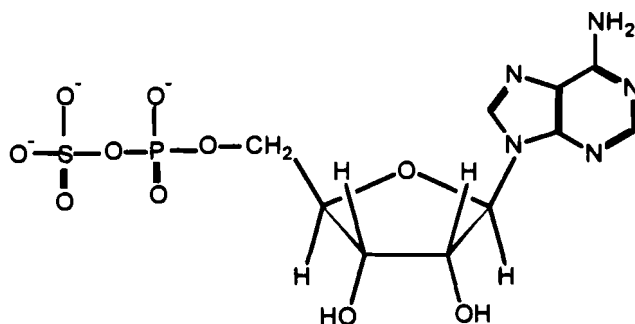


Figura III.1. A molécula de APS, que serve de substrato à redutase do APS.

As redutases do APS isoladas das bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio* são, geralmente, produzidas como componentes solúveis, no citoplasma da célula. Com o desenvolvimento das técnicas de imunocitologia foi, no entanto, possível verificar que a redutase isolada de *D. thermophilus* se encontra associada à membrana celular.¹⁰ Outros exemplos existem em que a enzima está associada à membrana. Na bactéria púrpura *Chromatium vinosum* a redutase do APS localiza-se nos cromatóforos, mas é facilmente libertada pela ruptura das células.¹¹ Por outro lado, a redutase do APS isolada da bactéria *Thiocapsa roseopersicina*, uma bactéria fototrófica oxidante de compostos de enxofre, foi descrita como sendo uma proteína membrana.¹²

De um modo geral a redutase do APS é uma proteína relativamente sensível à temperatura. Com a excepção da enzima purificada de *Thiobacillus denitrificans*, que não desnatura até 65 °C, todas as redutases descritas até à data perdem quase a totalidade da actividade após três meses de armazenamento a -20 °C.

Em termos das propriedades físico-químicas, bem como da especificidade para os substratos e composição do sítio activo as redutases do APS descritas parecem ser enzimas altamente conservadas. Por isso e também devido à sua ocorrência em todas as bactérias redutoras de sulfato, esta enzima pode ser considerada como um marcador deste grupo de

organismos. Um estudo das propriedades electroforéticas de várias redutases do APS de espécies dos géneros *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum*, revelou que as enzimas isoladas de *D. vulgaris*, *D. desulfuricans*, *D. gigas* e *Dtm. orientis* apresentam comportamentos semelhantes, enquanto que as enzimas das espécies *Dtm. nigrificans*, *Dtm. ruminis* e *D. salexigens* representam, aparentemente um grupo com propriedades electroforéticas distintas.¹³ Recentemente, têm sido usadas técnicas de imunologia com o objectivo de uma rápida detecção de organismos redutores de sulfato, através da reacção com anticorpos específicos para a redutase do APS.¹⁴ Da aplicação destas técnicas em extractos celulares de organismos oxidantes de enxofre e redutores de sulfato, foi observado que a redutase do APS é um potencial marcador imunológico das espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*. Por outro lado verificou-se que as bactérias dos géneros *Thiobacillus*, um organismo oxidante de enxofre, e *Desulfovibrio* reagem de um modo semelhante, sugerindo que as redutases destes microrganismos estão estruturalmente relacionadas.^{10,14}

As enzimas isoladas das bactérias redutoras de sulfato são proteínas de ferro-enxofre que contêm um grupo flavínico do tipo FAD. Possuem aproximadamente oito átomos de ferro e oito enxofres organizados em dois agregados [4Fe-4S]. A sua massa molecular varia entre 150 e 220 kDa. Em electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes observam-se duas bandas distintas, com massas moleculares aproximadas a 70 e 20 kDa, que poderão assumir uma estrutura do tipo $\alpha_2\beta$ ou $\alpha_2\beta_2$. Uma excepção é representada pela redutase do APS de *A. fulgidus*, que parece ser uma proteína homodimérica, com uma massa molecular de 80 kDa por cadeia polipeptídica.¹⁵ A comparação das propriedades de algumas redutase do APS, representativas de cada grupo de microrganismos é apresentada nas Tabelas III.1 e III.2.

Foram já propostos dois mecanismos de catálise da redutase do APS. O primeiro refere-se à oxidação directa do AMP e sulfito ao nível do APS, através da formação do intermediário fosfo-sulfito de adenosina. O segundo mecanismo envolve a ligação da molécula de sulfito à enzima; o complexo é depois oxidado a sulfato e subsequentemente dá-se a transferência do grupo sulfato para o mononucleotídeo receptor (ver secção III.7).

III.2. As redutases do APS das bactérias redutoras de sulfato

As redutases do APS isoladas deste grupo de microrganismos pertencem maioritariamente ao género *Desulfovibrio*. São tipicamente representadas pelas enzimas isoladas de *D. vulgaris* e *D. gigas* que constituem os exemplos mais bem estudados bioquímica e espectroscopicamente.^{6,16,17,18} No entanto, foi recentemente descrita a ocorrência desta enzima numa arqueobactéria redutora de sulfato termofílica denominada *Archaeoglobus fulgidus*, que apresenta propriedades espectroscópicas semelhantes às redutases análogas isoladas de outras bactérias redutoras de sulfato.⁴

Da análise da Tabela III.1 verifica-se que, de um modo geral, as redutases do APS isoladas de bactérias redutoras de sulfato são proteínas de elevada massa molecular que varia entre 150 e 220 kDa, constituídas por duas cadeias polipeptídicas distintas.¹⁹ A atribuição da estrutura e composição das subunidades tem sido uma questão controversa pelo facto da redutase do APS formar agregados durante a sua manipulação, dificultando assim a determinação correcta da massa molecular total da proteína.^{3,14,18}

Do ponto de vista espectroscópico, os resultados obtidos pela aplicação das diferentes técnicas (espectroscopias de UV/visível, RPE e Mössbauer) são consistentes com a presença de uma unidade FAD e dois agregados ferro-enxofre do tipo [4Fe-4S] por molécula.¹⁷ No entanto e contrariamente ao que tem sido descrito, foi recentemente sugerido que os agregados de ferro-enxofre existentes na redutase do APS de *D. vulgaris* Hildenborough não são do tipo [4Fe-4S], mas sim de um novo tipo com uma nuclearidade superior a quatro. Os mesmos autores propõem a existência de dois destes agregados por molécula.^{18,20}

O espectro de visível da redutase do APS exhibe uma banda larga centrada à volta dos 390 nm correspondente à absorção de centros ferro-enxofre e de ombros entre 445 e 475 nm que são devidos à presença da molécula de FAD. A redução da proteína com ditionito de sódio resulta na diminuição da absorção do espectro global devido à redução dos seus cromóforos.

A adição de sulfito à proteína nativa origina uma diminuição da absorção entre os 500 e 340 nm e um ligeiro aumento a 320 nm. Por analogia com o anteriormente verificado em compostos modelo, na oxidase da glucose e outras flavoproteínas, as alterações observadas são explicadas através da formação de uma aducto entre a molécula de sulfito e o grupo FAD da enzima.^{16,21,22} A incubação da enzima nativa com AMP não afecta o espectro óptico da redutase. No entanto a adição posterior de AMP à enzima reagida com sulfito tem como consequência um decréscimo geral da absorção do espectro de visível.¹⁵ Espectros de diferença entre a enzima reagida com sulfito e uma amostra nativa exibem picos característicos de grupos flavínicos e um pico de absorção negativa a 320 nm, que evidencia a formação de um aducto sulfito:FAD. O espectro de diferença entre a proteína reagida com AMP e sulfito e a proteína incubada com sulfito apresenta uma banda larga entre 385 e 450 nm que está associada com a redução dos agregados de ferro-enxofre. Tal facto sugere que a redução destes cromóforos na presença de sulfito é facilitada pelo AMP, possivelmente através da formação de APS e FADH₂.^{3,16}

As experiências de RPE efectuadas nesta enzima envolvem a adição sequencial dos substratos naturais (AMP, sulfito e APS), bem como a redução química de amostras com diferentes tempos de incubação. Uma caracterização espectroscópica detalhada foi levada a cabo por Lampreia e colaboradores na redutase do APS isolada de *D. gigas*.¹⁷

O espectro de RPE da redutase do APS de *D. gigas* no estado nativo apresenta um sinal quase isotrópico, com valores de *g* centrados a 2.02, detectável a temperaturas inferiores a 20 K. A forma do sinal e sua dependência em função da temperatura são característicos de um agregado ferro-enxofre do tipo [3Fe-4S]¹⁺, tal como o observado na ferredoxina II de *D. gigas*.²³ A contribuição desta espécie não é significativa representando apenas 0.1 a 0.25 spins/mole. A presença deste agregado ferro-enxofre na redutase é atribuída à autodestruição ou interconversão dos agregados [4Fe-4S]. A espectroscopia de Mössbauer confirma que, no estado nativo, a maioria dos átomos de ferro são diamagnéticos e portanto silensiosos em RPE.¹⁷

Tal como na espectroscopia de UV/visível, a adição de AMP ou APS a amostras nativas não causa alteração no espectro de RPE da redutase do APS. Por seu lado, a adição de sulfito provoca o aparecimento de um sinal rômboico de baixa intensidade do tipo " $g=1.94$ " (ver capítulo II), indicando uma pequena redução da enzima. A extensão da redução varia de amostra para amostra e poderá estar relacionada com a existência de AMP endógeno, intrinsecamente ligado à enzima.⁹ Contrariamente, a adição de AMP à enzima reagida com sulfito causa alterações profundas no espectro de RPE. Observa-se uma diminuição da intensidade do sinal isotrópico e o aparecimento de um sinal rômboico com valores de g iguais a 2.096, 1.94 e 1.89 ($S=1/2$). A quantificação deste sinal corresponde a uma concentração de spins que oscila entre 0.35 e 0.5 spins/mole.

A redução da enzima com ditionito de sódio ($pH > 9.0$), com um curto tempo de incubação (15 segundos) origina o desaparecimento total do sinal isotrópico, enquanto que o centro I atinge a intensidade máxima (aproximadamente 1 spin/mole), com valores de g iguais a 2.079, 1.939 e 1.897. A combinação das espectroscopias de RPE e Mössbauer revela que este sinal é devido a um agregado $[4Fe-4S]$ no estado reduzido e que a amostra se encontra semi-reduzida, indicando a existência de um outro centro de ferro-enxofre na forma oxidada, que é silencioso em RPE (Tabela III.2). A comparação deste espectro com o do centro I obtido pela adição de AMP e sulfito indica que, na presença dos substratos, o sinal do centro I reduzido desenvolve-se parcialmente, apresentando propriedades de relaxação, valores de g e largura de linha relativamente diferentes dos observados na amostra parcialmente reduzida com ditionito. As propriedades magnéticas obtidas pela espectroscopia de Mössbauer são também distintas. Estes dados parecem indicar que o AMP interacciona com o centro I e que este está envolvido no processo catalítico da enzima.^{3,6}

A redução total da enzima é obtida por incubação da amostra com ditionito de sódio, durante cerca de 30 minutos. O correspondente espectro de RPE exhibe um sinal complexo semelhante aos descritos para centros de ferro-enxofre em interacção magnética, confirmando deste modo a presença de outro agregado $[4Fe-4S]$, denominado centro II.²⁴ O espectro total contabiliza entre 1.5 e 1.7 spins/mole, dependendo da amostra. A redução

total do centro II não é possível nas condições normais, o que revela que o potencial de oxidação-redução deste centro é muito negativo. Os dois centros apresentam propriedades de relaxação diferentes. Enquanto que o centro I é detectável a temperaturas inferiores a 45 K, o centro II colapsa a temperaturas superiores a 25 K.

Os dados obtidos pela espectroscopia de Mössbauer são consistentes com o anteriormente descrito. A redutase do APS possui dois agregados [4Fe-4S] que, na forma nativa são diamagnéticos. O agregado [3Fe-4S] observado por RPE não é detectado por esta técnica, provavelmente devido à sua baixa concentração.

Os dois agregados são espectroscopicamente distintos. No estado reduzido o centro I é constituído por dois sítios não-equivalentes: um par de átomos de ferro com carácter ferroso e o outro par com carácter férrico. O par ferroso apresenta parâmetros de Mössbauer não usuais para este tipo de agregado, sugerindo um arranjo estrutural diferente do normalmente observado (Tabela III.3). Por outro lado, ao centro I está associado um potencial de oxidação-redução bastante elevado para um agregado [4Fe-4S], com um valor aproximadamente igual a 0 mV, também observado no agregado H da hidrogenase de ferro de *D. vulgaris*, na desidrogenase da trimetilamina e na oxidoredutase de ubiquinona:flavoproteína de transferência electrónica.^{25,26,27} O centro II foi identificado como um agregado [4Fe-4S] típico, com parâmetros de Mössbauer e potencial de oxidação-redução semelhantes aos dos agregados deste tipo.

A espectroscopia de Mössbauer mostra, também, que o centro I sofre alterações estruturais pela adição de AMP e sulfito, o que está de acordo com o observado em RPE. São, assim obtidas evidências para uma possível interacção directa entre o AMP e o centro I, na presença de sulfito. Os dados obtidos da espectroscopia de UV/visível em amostras reagidas com os substratos, confirmam a formação de uma aducto entre a flavina e a molécula de sulfito que, na presença de AMP, medeia a transferência de electrões para a redução dos agregados ferro-enxofre.

III.3. As redutases do APS das bactérias do género *Thiobacillus*

Nestes organismos oxidantes de compostos de enxofre, a redutase do APS foi isolada da estirpe *Thiobacillus thioparus* por Peck e colaboradores e posteriormente também da espécie *T. denitrificans*.^{7,28,29} Estes organismos têm a capacidade de oxidar compostos de enxofre a sulfato usando oxigénio ou nitrato como aceitadores de electrões. A redutase do APS está envolvida no processo de oxidação, catalisando a oxidação do sulfito (e AMP) a APS. A redutase isolada destes organismos apresenta propriedades bioquímicas semelhantes às das enzimas isoladas das bactérias redutoras de sulfato (Tabela III.1).

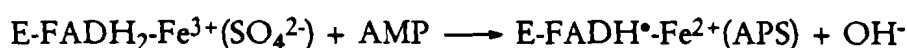
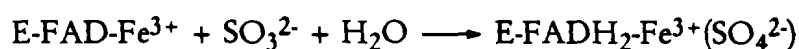
Em termos espectroscópicos as redutases do APS de *Thiobacilli* foram caracterizadas usando apenas a espectroscopia de UV/visível, não existindo até à data dados provenientes de outras técnicas espectroscópicas. Os estudos efectuados pela espectroscopia de UV/visível e por "Stopped-flow" visaram a determinação do mecanismo de catálise da redutase nestes organismos e avaliar qual o seu papel fisiológico na oxidação de compostos de enxofre.

O espectro de UV/visível da redutase do APS de *T. thioparus* é idêntico ao das redutases de *D. vulgaris* e *D. gigas*.^{3,28} Exibe um máximo de absorção a 395 nm e um ombro alargado entre 460 e 420 nm. A adição de sulfito à redutase do APS no estado nativo origina um decréscimo global da absorvância na região do visível, que não é observado nas redutases das bactérias redutoras de sulfato. O aumento a 320 nm observado nestas condições não se verifica, sugerindo a não formação do aducto entre a flavina e o sulfito. O espectro de diferença entre a amostra reagida com sulfito e a amostra nativa apresenta apenas picos de absorção máxima a 450 e 390 nm atribuídos à redução do grupo FAD. Também aqui a adição de AMP à enzima nativa não afecta o espectro de visível da redutase do APS. No entanto, a adição sequencial de AMP à enzima previamente incubada com sulfito resulta numa segunda diminuição da intensidade do espectro.^{7,8}

A aplicação da técnica de "Stopped-flow" indica que, na presença de sulfito, a flavina é rapidamente reduzida à forma FADH₂. As alterações produzidas pela adição de

AMP à enzima reagida com sulfito são causadas pela transferência de electrões da FADH_2 para os átomos de ferro presentes, através da formação de uma semi-quinona aniónica.⁷

Com base nos resultados obtidos, os autores propõem um mecanismo que, contrariamente ao das redutases do APS isoladas de bactérias redutoras de sulfato, não passa pela formação de um aducto. Deste modo, o mecanismo catalítico de oxidação do sulfito pela redutase do APS de *T. thioparus* envolve as seguintes reacções:



Num primeiro passo dá-se a redução da flavina a FADH_2 com a concomitante oxidação do sulfito a sulfato, que permanece ligado à enzima. Na presença de AMP, a flavina é oxidada a FADH^\bullet e o ferro é simultaneamente reduzido a Fe^{2+} . O mecanismo não explica, no entanto, a libertação do APS, nem o arranjo estrutural dos átomos de ferro, não contemplando a ocorrência de agregados de ferro-enxofre na transferência electrónica, contrariamente ao sugerido na redutase do APS de *D. vulgaris*.¹⁶ Contudo, como referido anteriormente, estudos imunológicos revelaram que as redutases do APS de bactérias redutoras de sulfato e do género *Thiobacillus* reagem de modo semelhantes aos anticorpos monoclonais, indicando alguma homologia estrutural do sítio activo e, provavelmente um mecanismo catalítico comum às duas enzimas.¹⁴

No capítulo VI será descrita a caracterização espectroscópica da redutase do APS purificada de *T. denitrificans* provando-se, em oposição ao observado por Adagi e colaboradores, a formação de aducto e o envolvimento dos agregados ferro-enxofre na oxidação do sulfito a sulfato.

III.4. As redutases do APS de bactérias fototróficas de enxofre

A redutase do APS foi isolada das bactérias *Thiocapsa roseopersicina*, *Chlorobium limicola* e *Chromatium vinosum* (Tabela III.1).^{11,12,30} Não foram efectuados estudos espectroscópicos nestas proteínas não se sabendo, por isso, se a adição dos substratos naturais tem o mesmo efeito que nas redutases de *D. vulgaris* e de *D. gigas*.

A presença de grupos hémicos na redutase do APS de *Thiocapsa roseopersicina* constitui uma característica única desta espécie. A enzima apresenta uma massa molecular aparente de 180 kDa. Contém um grupo flavínico, quatro átomos de ferro não-hémico, seis átomos de enxofre inorgânico e dois grupos hémicos do tipo citocromo c. O espectro de visível da redutase nativa apresenta picos de absorção máxima a 522 e 407 nm e ombros alargados a 561, 450 e 350 nm. O espectro da proteína reduzida com ditionito mostra máximos a 550, 520 e 417 nm, típicos de proteínas que possuem hemoss.

Trüper e Rogers explicam a presença de grupos hémicos na redutase do APS de *Thiocapsa roseopersicina* em termos da localização celular da enzima. Neste microrganismo a enzima é membranar, estando deste modo inserida numa estrutura altamente complexa e rígida, enquanto que nas espécies pertencentes aos géneros *Desulfovibrio* e *Thiobacillus* a redutase do APS se encontra no citoplasma, que é um sistema mais flexível.

A transferência electrónica na molécula da redutase do APS deste organismo parece dar-se de uma forma simples e directa. A molécula de sulfito é oxidada a sulfato na presença de AMP, através da formação de APS. Concomitantemente a flavina é reduzida e os electrões são posteriormente transferidos para os hemoss e de seguida para um citocromo c₅₅₂, que funcionaria como aceitador final de electrões. A função dos quatro átomos de ferro não-hémico não é sugerida.

III.5. A redutase do APS da arqueobactéria *Archaeoglobus fulgidus*

A redutase do APS de *Archaeoglobus fulgidus* foi purificada pela primeira vez por Speich e Trüper, em 1988.^{4,31} A proteína isolada deste organismo, uma arqueobactéria termofílica redutora de sulfato, apresenta propriedades físico-químicas semelhantes às redutases do APS caracterizadas até à data (Tabela III.1).¹⁵ De referir que, contrariamente às restantes enzimas purificadas de BRS, a proteína é descrita como um homodímero com massa molecular de 80 kDa por cadeia polipeptídica.³¹ Cada molécula possui dois agregados de [4Fe-4S] e uma unidade FAD como grupos prostéticos.

Em termos espectroscópicos, a redutase do APS de *A. fulgidus* apresenta características idênticas à redutase de *D. gigas*.¹⁷ O espectro de RPE da enzima nativa contém um sinal típico de agregados [3Fe-4S] na forma oxidada, centrado a $g=2.04$, cuja concentração é inferior a 0.01 spin/mole. Adição dos substratos, AMP e sulfito, implica o aparecimento de um sinal do tipo " $g=1.94$ ", típico de um agregado [4Fe-4S] reduzido. Este estado é caracterizado por um sinal rômboico (centro I) com valores de g iguais a 2.098, 1.948 e 1.910. A redução química da redutase do APS com viologénio de metilo ou ditionito de sódio, com um curto tempo de redução, origina o desenvolvimento total do centro I, que exhibe parâmetros de RPE ligeiramente diferentes dos observados pela adição de AMP e sulfito. O centro representa cerca de 50% absorção total do espectro de RPE da enzima parcialmente reduzida. A redução extensiva da proteína (> 15 minutos de incubação com ditionito de sódio a $pH > 9$) produz um sinal de RPE complexo, idêntico ao exibido pela redutase do APS de *D. gigas*. Por analogia com esta última o sinal de RPE observado no estado completamente reduzido, é atribuído à interacção magnética dos dois agregados [4Fe-4S]. A integração deste sinal de interacção corresponde a 1.75 spin/mole, sugerindo que ao centro II está associado um potencial de oxidação-redução muito negativo, não sendo possível a sua redução total nas condições experimentais usadas.

A comparação das propriedades gerais das redutases do APS isoladas de bactérias redutoras de sulfato (ver as Tabelas III.1 e III.2) revela que estas enzimas constituem um

grupo altamente conservado, a nível das propriedades fisiológicas, bem como na composição do sítio activo.

III.6. A formação de aducto entre a flavina da redutase do APS e o sulfito

A formação de um aducto entre a flavina e o sulfito é um passo central no mecanismo catalítico da redutase do APS. Até ao presente momento, a ocorrência do aducto é apenas descrita nas redutases isoladas das bactérias redutoras de sulfato, nomeadamente das espécies pertencentes ao género *Desulfovibrio*.^{16,32}

A reactividade de flavoproteínas com o sulfito foi primeiramente descrita por Swoboda e Massey, na oxidase da glucose.³³ Esta reacção é caracterizada por um decréscimo da absorção do espectro de visível da proteína e concomitantemente aparecimento de uma banda centrada a 320 nm, sendo um processo independente da presença de oxigénio ou qualquer outro aceitador de electrões. O espectro resultante é globalmente semelhante ao de uma flavoproteína no estado reduzido.

Por analogia com o observado em reacções entre o sulfito e nucleotídeos pirimidínicos, foi proposto que a adição de sulfito na posição N(5) do anel isoaloxazina da molécula de FAD produzia um aducto entre o grupo FAD e o sulfito (ver Figura III.2).²¹ Mais tarde, foi verificado que o mecanismo proposto era válido e aplicável a várias flavoproteínas.²² De um modo geral, a formação do aducto ocorre principalmente em flavoproteínas que apresentem uma elevada afinidade para o oxigénio (oxidases), enquanto que as flavoproteínas com actividade de desidrogenase (maior afinidade para o ferricianeto que para o oxigénio) não interactivam com o sulfito. No entanto existem algumas excepções, nomeadamente na oxidase do glicolato que apresenta uma maior afinidade para o ferricianeto do que para o oxigénio, existindo contudo a formação do aducto pela adição de sulfito.

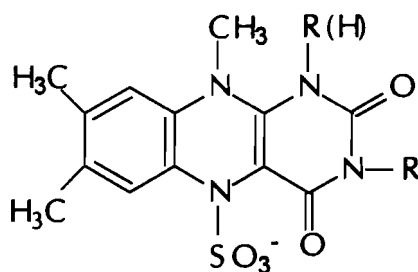


Figura III.2. A estrutura do aducto entre a flavina e a molécula de sulfito (adaptado da referência 22).

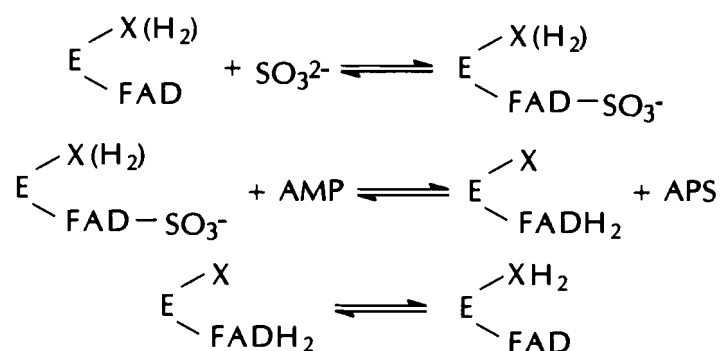
No caso da redutase da redutase do APS, tal como a oxidase do glicolato, a enzima é mais reactiva para o ferricianeto do que para o oxigénio. No entanto, é observada a formação de um aducto quando da adição de sulfito, que parece ser essencial no mecanismo global da enzima.

III.7. O mecanismo da redutase do APS

No início da década de 70 foram publicados dois artigos que apresentam dois possíveis mecanismos de catálise da redutase do APS de *D. vulgaris* Hildenborough.^{16,32} O primeiro, descreve a oxidação directa de sulfito (e AMP) a APS, através da formação de intermediário do tipo fosfo-sulfito de adenosina. O segundo mecanismo envolve a oxidação do sulfito ligado à enzima a sulfato, que é seguidamente transferido para um mononucleotídeo, produzindo-se APS.

Devido à elevada instabilidade da molécula intermediária referida no primeiro mecanismo e também devido à ocorrência de interacção entre o sulfito e a enzima, mesmo na ausência de AMP, a segunda proposta foi considerada mais adequada.

Com base em estudos de adição sequencial de AMP e sulfito, seguidos pela espectroscopia de UV/visível, os autores propuseram, então, o seguinte mecanismo para a redutase do APS de *D. vulgaris*:¹⁶



O primeiro passo envolve a associação reversível do sulfito ao grupo FAD da enzima, originando a formação de um aducto na posição N(5) da flavina. X representa um cromóforo, provavelmente ferro não-hémico no estado oxidado ou reduzido, X(H₂). O passo seguinte consiste na transferência do grupo que contém enxofre para um mononucleotídeo receptor (AMP). Dado que a transferência do enxofre para o AMP implicava a redução do cromóforo X, o equilíbrio da segunda reacção estaria deslocado no sentido da formação de aducto, sendo necessária a redução do cromóforo para deslocar o equilíbrio na direcção oposta.

O mecanismo é apoiado pelas observações de que a incubação da enzima com sulfito produz uma diminuição global do espectro de absorção e que a adição posterior de AMP origina uma segunda diminuição da absorção, que parece dever-se à redução do ferro não-hémico. Assim, os autores concluíram que a presença de AMP estimulava a produção de APS. No entanto, o mecanismo proposto não explica de que modo a FADH₂ é reoxidada, nem demonstra o envolvimento do ferro não-hémico no mecanismo de acção da redutase do APS.

Estudos preliminares de RPE a 17 K, revelaram, pela primeira vez, o possível envolvimento do ferro não-hémico na redutase do APS de *D. vulgaris*.^{6,9,34} A observação de um sinal do tipo "g=1.94" após a adição de sulfito e AMP e/ou por redução química, típico

de agregados ferro-enxofre reduzidos, constituiu uma boa evidência da existência de agregados ferro-enxofre e seu envolvimento na catálise. O efeito do *pHMB* (um agente químico que interaccua com os agregados ferro-enxofre) na redutase do APS de *D. vulgaris* foi também estudado. Foi demonstrado que este composto químico inibia a actividade da redutase quando se usava ferricianeto como aceitador de electrões, mas que na presença de citocromo *c* ou viologénio de metilo o *pHMB* não exercia qualquer efeito na actividade enzimática da redutase do APS.

Dos resultados obtidos pelas espectroscopias de visível e de RPE e ainda por estudos cinéticos na presença de vários transportadores de electrões, os autores propuseram um mecanismo de acção da redutase, com base nas seguintes observações: 1) a adição de sulfito origina o aparecimento de um sinal, com baixa intensidade, do tipo " $g=1.94$ ", que está relacionado com a presença de AMP endógeno na amostra; 2) a adição de AMP não produz alterações no espectro de RPE. No entanto se a uma amostra reagida com sulfito, for adicionado AMP, o sinal a $g=1.94$ atinge a sua intensidade máxima. A ordem de adição dos substratos é arbitrária; 3) o efeito do *pHMB* só é visível se este for adicionado inicialmente. A incubação prévia da enzima com *pHMB* e subsequente adição de AMP e sulfito impede o aparecimento do sinal rômboico no espectro de RPE, sugerindo que o local de interacção do AMP é um centro de ferro-enxofre.

Estudos cinéticos com diferentes transportadores electrónicos (ferricianeto de potássio, citocromo *c* e viologénio de metilo), acoplados à adição de *pHMB* revelaram que existem vários caminhos para o fluxo electrónico entre os diferentes transportadores e a redutase. Apenas a redução enzimática do ferricianeto é inibida pelo *pHMB* e parece depender dos agregados ferro-enxofre. A redução do citocromo *c* requer a presença de aniões super-óxido, os quais são obtidos pela redução do oxigénio através de um grupo $FADH_2$.³⁵ Quando é usado viologénio de metilo reduzido, dá-se a transferência de electrões deste para o complexo enzima-sulfito. Considerando estes factos, os autores desenharam o mecanismo representado na Figura III.3.

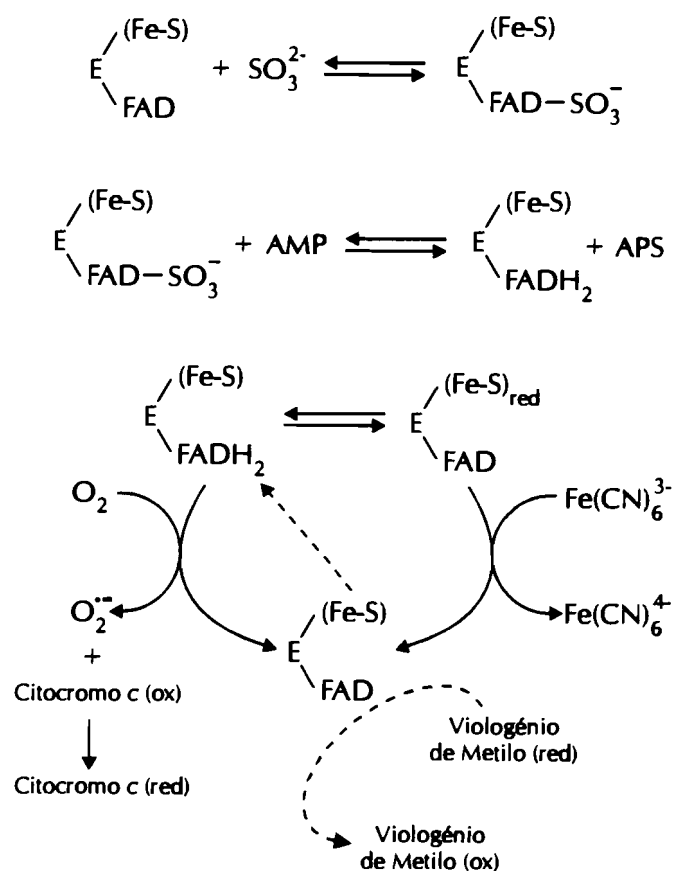


Figura III.3. O mecanismo de catálise da redutase do APS proposto, em 1982, por Bramlett e colaboradores (adaptado da referência 36).

Apesar do mecanismo proposto descrever um possível processo enzimático da redutase do APS isolada de bactérias, continua a não demonstrar o envolvimento inequívoco dos agregados ferro-enzofre, nem a sua posição no mecanismo catalítico da enzima.

Recentemente Lampreia e colaboradores efectuaram um estudo intensivo sobre as características espectroscópicas dos centros redox da redutase do APS de *D. gigas*.¹⁷ A combinação da informação obtida pela aplicação das espectroscopias de UV/visível, RPE e Mössbauer permitiu demonstrar inequivocamente o envolvimento de um agregado do tipo

[4Fe-4S] (centro I) e da unidade flavínica no mecanismo de catálise da redutase do APS. Os parâmetros espectroscópicos obtidos para o centro I, nomeadamente os valores do desvio isomérico e desdobramento de quadrupolo, bem como o potencial de oxidação-redução (aproximadamente 0 mV), indicam que esta enzima possui um agregado [4Fe-4S] com características únicas, cujas propriedades magnéticas são alteradas pela adição de AMP e sulfito. A enzima possui um segundo agregado de ferro-enxofre que apresenta características típicas de um agregado deste tipo. A redução da flavina ocorre a um potencial de oxidação-redução aproximadamente igual a +160 mV e parece envolver dois electrões.

Com base nos resultados obtidos os autores propõem um mecanismo (Figura III.4) que, no entanto, deixa alguns aspectos em aberto.^{4,15,19} Contudo, parece estar provado que, na presença de sulfito, existe uma interacção entre o centro I e o AMP. O modo de interacção entre estas duas componentes não é conhecido ainda. Por outro lado a determinação do papel do centro II no mecanismo da redutase revela-se complexa. Este centro poderá funcionar como aceitador de electrões durante a reoxidação da FADH₂.

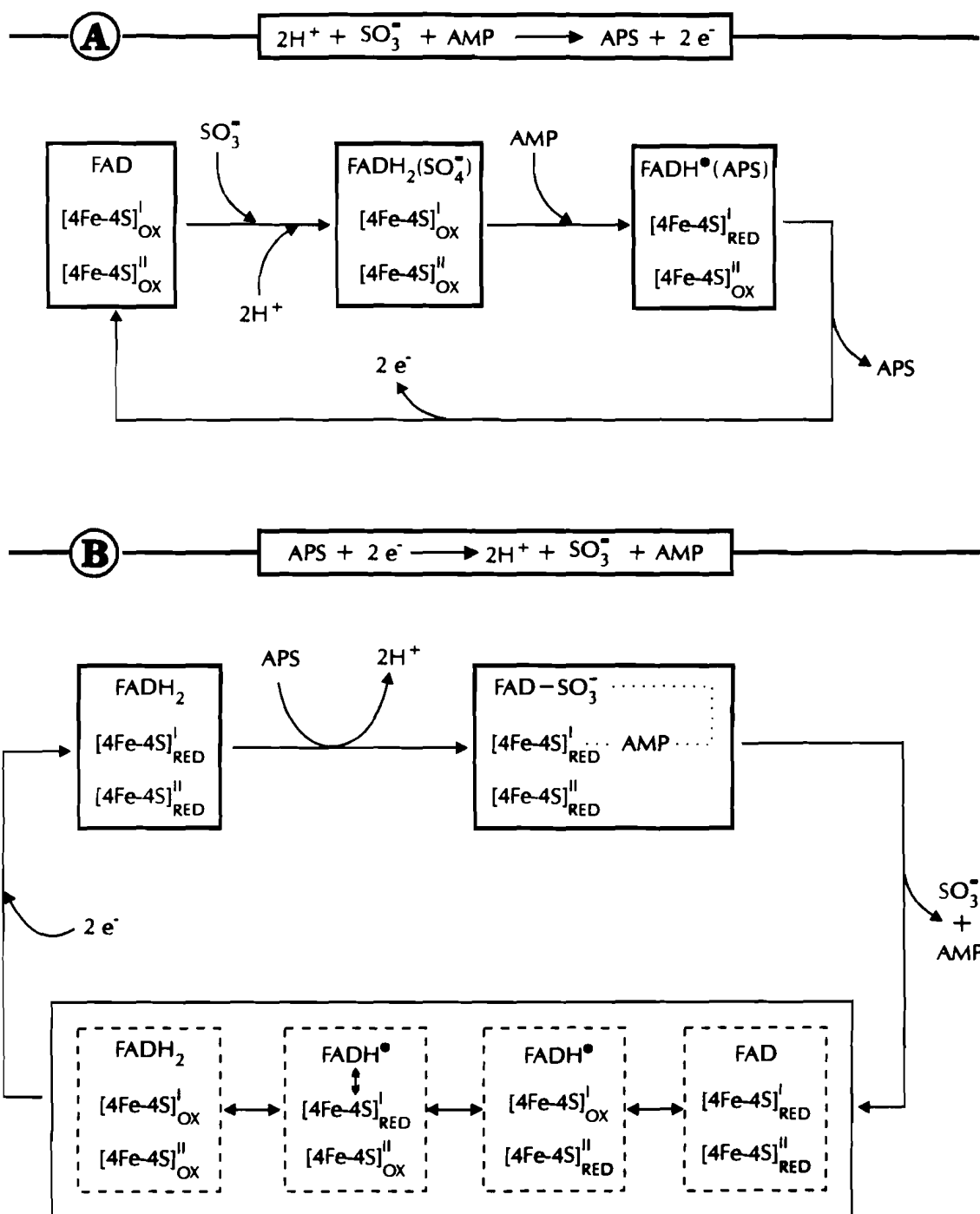


Figura III.4. O mecanismo catalítico da redutase do APS proposto por Lampreia e colaboradores, em 1989. (A) reacção inversa à que ocorre fisiologicamente nas BRS (este processo não passaria pela formação de aducto); e (B) reacção directa com formação de aducto (adaptado das referências 15 e 19).

Tabela III.1

Caracterização bioquímica de algumas redutases do APS anteriormente descritas

Organismo	M.M. (kDa)	Composição das subunidades	Teor em Ferro (Fe/mole)	Teor em FAD (FAD/mole)	pH _{óp.}	K _m sulfito (mM)	K _m AMP (mM)	Ref.
<i>Redutases do APS de bactérias redutoras de sulfato</i>								
<i>D. vulgaris</i> Hidenborough	~ 220	72.0/20.0 ($\alpha_3\beta$)	6-12	1	7.4	2.0	0.30	6,9
	186	67.8/25.6 ($\alpha_2\beta_2$)	~ 6	1	—	0.13	0.05	18
<i>D. gigas</i>	160	70.0/23.0 ($\alpha_2\beta$ ou $\alpha_2\beta_2$)	8-9	1	7.4	0.34	0.16	19
<i>D. salexigens</i>	180	—	7-8	1	7.5	0.76	0.31	19
<i>D. desulfuricans</i> G100A	190	70.0/26.0 ($\alpha_2\beta_2$)	~ 6	1	—	—	0.40	14
<i>Desulfobulbus</i> <i>propionicus</i>	175	—	8	1	7.7	1.3	0.09	37
<i>Archaeoglobus</i> <i>fulgidus</i>	160	80.0 (α_2)	8	1	8.0	1.3	—	4,31
<i>Redutases do APS de bactérias oxidantes de enxofre</i>								
<i>T. thioparus</i>	170	—	8-10	1	7.4	2.5	0.1	28
<i>T. denitrificans</i>	—	—	6-11	1	7.2	1.5	0.04	29
<i>Redutases do APS de bactérias fototróficas de enxofre</i>								
<i>Thiocapsa</i> <i>roseopersicina</i>	180	—	4 + 2 hemos	1	8.0	1.5	0.073	12
<i>Chl. limicola</i>	210	—	①	1	8.5	0.91	0.2	30
<i>Chl. vibrioforma</i> f.s. <i>thiosulfatophilum</i>	180	—	4-6	1	8.0	0.17	0.13	38

① Sabe-se que a enzima possui ferro mas a sua quantificação não foi efectuada

Tabela III.2

Caracterização espectroscópica de algumas redutases do APS isoladas de BRS^①

Organismo	Espectroscopia de Visível	Espectroscopia de RPE			
		Valores de g (concentração em spins/mole)			
	Máximo de absorção ^② (nm)	Nativo "g = 2.02"	AMP + sulfito Centro I	Semi-reduzido Centro I	Totalmente reduzida ^③ Centro I + Centro II
<i>D. gigas</i>	392	2.025, 2.002, 2.002 (0.1-0.2)	2.069, 1.940, 1.890 (0.3-0.52)	2.079, 1.939, 1.897 (0.75-1.13)	— (1.5-1.79)
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	375	2.031, 2.002, 2.002 (0.21)	2.092, 1.945, 1.899 (—)	2.070, 1.942, 1.891 (0.7-0.95)	— (1.8)
<i>D. desulfuricans</i> Berre-eau	380	2.021, 2.002, 2.002 (0.1-0.22)	2.073, 1.936, 1.887 (0.1-0.22)	2.072, 1.935, 1.886 (0.85-1.10)	— (1.6-1.9)
<i>D. salexigens</i>	392	2.027, 2.008, 2.008 (0.038-0.1)	2.093, 1.944, 1.896 (0.15-0.25)	2.083, 1.939, 1.899 (0.90-1.00)	— (1.8-1.96)
<i>D. thermophilus</i>	394	2.025, 2.004, 2.004 (—)	2.097, 1.938, 1.888 (—)	2.088, 1.939, 1.897 (—)	— (—)
<i>Desulfomicrobium</i> <i>baculatus</i> ^④	385	2.022, 2.002, 2.002 (0.15)	2.096, 1.946, 1.894 (—)	2.085, 1.939, 1.895 (0.85-1.15)	— (1.65-1.85)
<i>Archaeoglobus</i> <i>fulgidus</i>	400	2.040, 2.020, 2.020 (0.0035)	2.097, 1.948, 1.910 (0.17)	2.095, 1.947, 1.909 (1.00)	— (1.75)

① A tabela foi adaptada das referências 19 e 15.

② Os espectros de visível das redutases do APS são praticamente idênticos, variando apenas a posição do pico de absorção máxima.

③ Os valores de g não são atribuídos por o espectro de RPE consistir num sinal de interação.

④ Este organismo foi anteriormente classificado como *Desulfovibrio baculatus*.

Tabela III.3

Parâmetros de Mössbauer para os centros Fe-S da redutase do APS de D. gigas^①

Centro Fe-S	Temp. (K)	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	A (kG)			Γ	η
				A_x (g_x)	A_y (g_y)	A_z (g_z)		
Nativa	150	1.22	0.40	—	—	—	0.28	—
		0.98	0.40				0.28	
		0.79	0.40				0.28	
		0.50	0.39				0.28	
	4.2	1.44	0.45	—	—	—	0.25	0.7
		1.30	0.45				0.25	0.9
		1.12	0.45				0.25	0.9
		0.71	0.43				0.28	0.9
Centro I	150	1.69	0.56	—	—	—	0.31	—
		1.04	0.47				0.29	
	4.2	2.20	0.63	180.0	125.0	350.0	0.40	0.7
		1.30	0.54	-240.0	-235.0	-190.0	0.35	0.7
Centro II	130	1.33	0.53	—	—	—	0.35	—
		0.79	0.50				0.35	
	4.2	1.50	0.60	180.0	60.0	55.0	0.35	0.5
		1.10	0.55	-215.0	-255.0	-200.0	0.35	0.5

^① A tabela foi adaptada das referências 17 e 19.

III.8. Bibliografia

1. LeGall, J., e Fauque, G. 1988. In "Biology of anaerobic microorganisms", Ed. A.J.B. Zehnder, págs. 587-639.
2. Fauque, G, LeGall, J., e Barton, L.L. 1991. In "Variation in autotrophic life", Ed. J.M. Shively e L.L. Barton, págs. 271-337, Academic Press, New York.
3. Lampreia, J., Moura, I., Xavier, A.V., LeGall, J., Peck, H.D. Jr., e Moura, J.J.G. 1990. In "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes", Ed. F. Müller, Vol. III págs. 333-355.
4. Lampreia, J., Fauque, G., Speich, N., Dahl, C., Moura, I., Trüper, H.G., e Moura, J.J.G. 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 342-347.
5. Ishimoto, M., e Fujimoto, D. 1961. *J. Biochem.* 49, 103-109.
6. Bramlett, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* 250, 2979-2986.
7. Adachi, K., e Suzuki, I. 1977. *Can. J. Biochem.* 55, 91-98.
8. Lyric, R.M., e Suzuki, I. 1970. *Can. J. Biochem.* 48, 344-354.
9. Bramlett, R.N. 1975. Tese de Doutorado, Universidade da Georgia, Athens, USA.
10. Kremer, D.R., Veenhuis, M., Fauque, G., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Lampreia, J., Moura, J.J.G., e Hansen, T.A. 1988. *Arch. Microbiol.* 150, 296-301.
11. Schwenn, J.D., e Biere, M. 1979. *FEMS Microbiol. Lett.* 6, 19-22.
12. Trüper, H.G., e Rogers, L.A. 1971. *J. Bacteriol.* 108, 1112-1121.
13. Skyring, G.W., e Trudinger, P.A. 1972. *Can. J. Microbiol.* 19, 375-380.
14. Odom, J.M., Jessie, K., Knodel, E., e Emptage, M. 1991. *Appl. Env. Microbiol.* 57, 727-733.
15. Lampreia, J., Pereira, A.S., e Moura, J.J.G. 1994. *Methods Enzimology* 243, em impressão.

16. Michaels, G.B., Davidson, J.T., e Peck, H.D., Jr. 1970. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 321-328.
17. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Huynh, H.B., e Moura, J.J.G. 1990. *Eur. J. Biochem.* 188, 653-664.
18. Verhagen, M.F.J.M., Kooter, I.M., Wolbert, R.B.G., e Hagen, W.R. 1994. *Eur. J. Biochem.* 221, 813-837.
19. Lampreia, J. 1989. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, U.N.L.
20. Verhagen, M.F.J.M., Kooter, I., Wolbert, R.B.G., e Hagen, W.R. 1993. *J. Inorg. Biochem.* 51, 19.
21. Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, A., Howell, L., Mayhew, S.G., Matthews, R.G., e Foust, G.P. 1969. *J. Biol. Chem.* 244, 3999-4006.
22. Müller, F., e Massey, V. 1969. *J. Biol. Chem.* 244, 4007-4016.
23. Huynh, B.H., Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münk, E. 1980. *J. Biol. Chem.* 255, 3242-3244.
24. Cammack, R., Dickinson, D.P.E., e Johnson, C.E. 1977. In "Iron-sulfur proteins", Ed. W. Lovenberg, Vol. III págs. 381-417.
25. Patil, D.S., Moura, J.J.G., He, S.H., Teixeira, M., Prickril, B.C., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., e Huynh, B.H. 1988. *J. Biol. Chem.* 263, 18732-18788.
26. Pierik, A.J., Hagen, W.R., Redeker, J.S., Grande, H.J., Veeger, C., Mutsaers, P.H.A., Sands, R.H., e Dunham, W.R. 1992. *Eur. J. Biochem.* 209, 63-72.
27. Beckmann, J.D., e Frerman, F.E. 1985. *Biochem.* 24, 3913-3921.
28. Peck, H.D., Jr., Deacon, T.E., e Davidson, J.T. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 96, 429-446.
29. Bowen, T.J., Happold, F.C., e Taylor, B.F. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 566-576.
30. Kirchhoff, J., e Trüper, H.G. 1974. *Arch. Microbiol.* 100, 115-120.

31. Speich, N., e Trüper, H.S. 1988. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1419-1425.
32. Michaels, G.B., Davidson, J.T., e Peck, H.D., Jr. 1971. In "Flavins and Flavoproteins", Ed. H. Kamin, págs. 555-580, University Park Press, Baltimore.
33. Swoboda, B.E.P., e Massey, V. 1966. *J. Biol. Chem.* 241, 3409-3416.
34. Peck, H.D., Jr., Bramlett, R., e DerVartanian, D.V. 1972. *Z. Naturforsch* 27b, 1084-1086.
35. Massey, V., Palmer, G., e Ballou, D. 1971. In "Flavins and Flavoproteins", Ed. H. Kamin, págs. 349-361, University Park Press, Baltimore.
36. Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B298, 443-446.
37. Stille, W., e Trüper, H.G. 1984. *Arch. Microbiol.* 137, 145-150.
38. khanna, S.K., e Nichols, D.J. 1983. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1365-1370.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA REDUTASE DO APS DE *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* ATCC 27774

IV. Caracterização espectroscópica da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

1. Introdução	125
2. Purificação da redutase do APS	126
3. Caracterização bioquímica da redutase do APS	128
3.1. Determinação da massa molecular	128
3.2. Composição das subunidades	128
3.3. Composição em ácidos aminados	131
3.4. Sequência de ácidos amidos da região N-terminal das subunidades	132
3.5. Conteúdo em ferro	133
3.6. Conteúdo em flavina	134
4. Estudos cinéticos	134
4.1. Determinação dos parâmetros cinéticos	134
4.1.1. Ferricianeto como aceitador de electrões	136
4.1.2. Citocromo c como aceitador de electrões	136
4.2. Determinação do pH _{óptimo}	139
4.3. Estabilidade da enzima. Reactivação da redutase do APS	142
5. Caracterização espectroscópica da redutase do APS	144
5.1. Espectroscopia de UV/visível	144
5.2. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de visível	145
5.2.1. Adição de sulfito e AMP à redutase do APS	145
5.2.2. Adição de ditionito de sódio à redutase do APS	148
5.3. Espectroscopia de RPE	148
5.4. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de RPE	149
5.4.1. Adição de AMP e sulfito	149
5.4.2. Redução parcial da redutase do APS	151
5.4.3. Redução total da redutase do APS	152
5.5. Espectroscopia de Mössbauer	155

6. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS	160
6.1. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de UV/visível	160
6.2. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de RPE	163
7. O efeito do <i>p</i> HMB na redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i>	166
7.1. Titulação das cisteínas com <i>p</i> HMB	168
7.2. O efeito do <i>p</i> HMB na actividade da redutase do APS	170
7.3. Efeito do <i>p</i> HMB no espectro de UV/visível da redutase do APS	172
7.4. Efeito do <i>p</i> HMB no espectro de RPE da redutase do APS	176
8. Discussão	181
9. Bibliografia	186

IV.1. Introdução

A redutase do APS tem sido extensivamente estudada desde 1961, com o objectivo de estabelecer o seu mecanismo reaccional, tendo sidos propostos alguns mecanismos sem, no entanto, existirem provas suficientes para apoiar qualquer um (ver capítulo III).¹

Neste capítulo, e no seguinte, será descrita a purificação e caracterização bioquímica e espectroscópica da redutase do APS isolada da bactéria anaeróbica redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCCC 27774, que também pode utilizar, alternativamente, o nitrato como aceitador de final de electrões. Será, também, apresentado o efeito de um reagente mercurial (pHMB) no centro activo da redutase do APS, bem como o de pequenas moléculas, tais como o óxido nítrico e o cianeto.

IV.2. Purificação da redutase do APS

A bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 foi crescida em meio de lactato na presença de nitrato como aceitador final de electrões. O extracto celular foi preparado de acordo com o método descrito por Liu e Peck.²

O processo global da purificação da redutase do APS de *D. desulfuricans*, normalmente utilizado será descrito em seguida. Todas as etapas da purificação foram efectuadas a 4 °C e a pH 7.6, excepto quando mencionado em contrário.

O extracto celular é aplicado numa coluna de DEAE-52 (6 x 50 cm) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. Após a aplicação do extracto, a coluna é lavada com 10 mM Tris-HCl para separar as proteínas não acídicas, que não adsorveram à resina e que são, na maioria, citocromos (citocromo c_3 e mono-hémico). Seguidamente, aplica-se um gradiente iónico linear crescente entre 10 e 500 mM Tris-HCl, com um volume total de 4 litros. Com o aumento da força iónica podem-se observar várias bandas, com diferentes colorações. Na coluna, distinguem-se componentes citocrómicos (banda vermelha), componentes proteicos que contêm centros ferro-enxofre (banda acastanhada), flavínicos (banda amarela) ou ainda combinações destes, como por exemplo a desulfoviridina

(banda verde). A fracção maioritária da redutase do APS é eluída entre 150 e 170 mM, depois da rubreritrina e de uma flavoproteína, da desulfoferrodoxina, da desidrogenase do formato, de alguns citocromos (citocromo cc_3 e "split Soret") e da proteína de "6 ferros". Na coluna ficam, ainda, adsorvidas a hidrogenase, a oxidoredutase do aldeído, a desulfoviridina, a rubredoxina, a flavodoxina e a ferredoxina. A fracção recolhida é concentrada num ultraconcentrador do tipo Diaflo equipado com uma membrana YM30. Depois de concentrada, a fracção da redutase do APS é aplicada numa coluna de HTP (4.5 x 16 cm) equilibrada com 160 mM Tris-HCl. Esta etapa tem como objectivo principal a remoção da maior parte dos componentes citocrómicos da fracção que contém a redutase do APS. A eluição faz-se usando um gradiente decrescente de Tris-HCl, entre 160 e 10 mM, seguido de um outro, crescente, em tampão fosfato de 1 a 200 mM. Normalmente, a redutase do APS é eluída durante o gradiente decrescente em Tris-HCl, a uma força iónica aproximada de 50 mM. A fracção obtida apresenta uma razão de pureza, A_{278}/A_{388} , igual a 8.7. De seguida, a fracção é dialisada contra água, durante uma noite e posteriormente concentrada num Diaflo equipado com uma membrana YM30. As etapas seguintes são efectuadas em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A fracção da redutase do APS é aplicada (um volume aproximado de 15 ml) numa coluna DEAE 5PW (*Waters Associates*, 2.01 x 20 cm) equilibrada com Tris-HCl, pH 7.0. Usa-se um gradiente iónico linear entre 10 e 250 mM, durante 3 horas, com um caudal de 3 ml/min. A redutase do APS é eluída a uma força iónica aproximada de 170 mM. A razão de pureza da proteína recolhida é aproximadamente igual a 7.4. A fracção é concentrada num Diaflo com membrana YM30 e dialisada por adições sucessivas de água destilada até se atingir uma força iónica aproximada de 10 mM. Este último passo de purificação é repetido uma segunda vez, usando as mesmas condições. A fracção da redutase do APS pura apresenta uma razão de pureza, A_{278}/A_{388} , entre 4.9 e 5.2, dependendo das preparações. A pureza da proteína é confirmada por electroforese em gel de poliacrilamida (10%), em condições não desnaturantes e também por cromatografia de filtração em gel.

Por vezes é necessário efectuar-se uma outra etapa, por cromatografia de exclusão molecular, numa coluna de filtração em gel semi-preparativa TSK G-3000 SW (*Pharmacia*,

2.1 x 60 cm). A eluição das proteínas faz-se com um gradiente isocrático de 0.3 M em NaCl e 0.1 M de tampão Tris-HCl, pH 7.0.

Na Figura IV.1 é apresentado um esquema descritivo da purificação da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

IV.3. Caracterização bioquímica da redutase do APS

IV.3.1. Determinação da massa molecular

A massa molecular da redutase do APS foi determinada por cromatografia de gel em sistema de HPLC usando uma coluna TSK G-3000 SW (*Pharmacia*, 0.7 x 60 cm), com limites de exclusão molecular compreendidos entre 5 e 300 kDa. A eluição foi feita com tampão 0.3 M NaCl em 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, com um caudal de 0.25 ml/min. Deste modo, estimou-se uma massa molecular da redutase do APS aproximadamente igual a 165 ± 5 kDa. Este resultado é consistente com os valores obtidos em outras redutases purificadas anteriormente de outras espécies de bactérias redutoras de sulfato.³

IV.3.2. Composição das subunidades

A composição das subunidades da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi determinada por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 0.1% SDS, a pH 8.8, de acordo com o método de Laemmli (Apêndice A).⁴

Após coloração com Azul de Comassie, observam-se duas bandas com massas moleculares distintas. Por comparação com a mobilidade dos padrões usados, verifica-se que a massa molecular de cada subunidade é aproximadamente igual a 70 ± 2 (α) e 20 ± 2 (β) kDa, respectivamente (Figura IV.2).

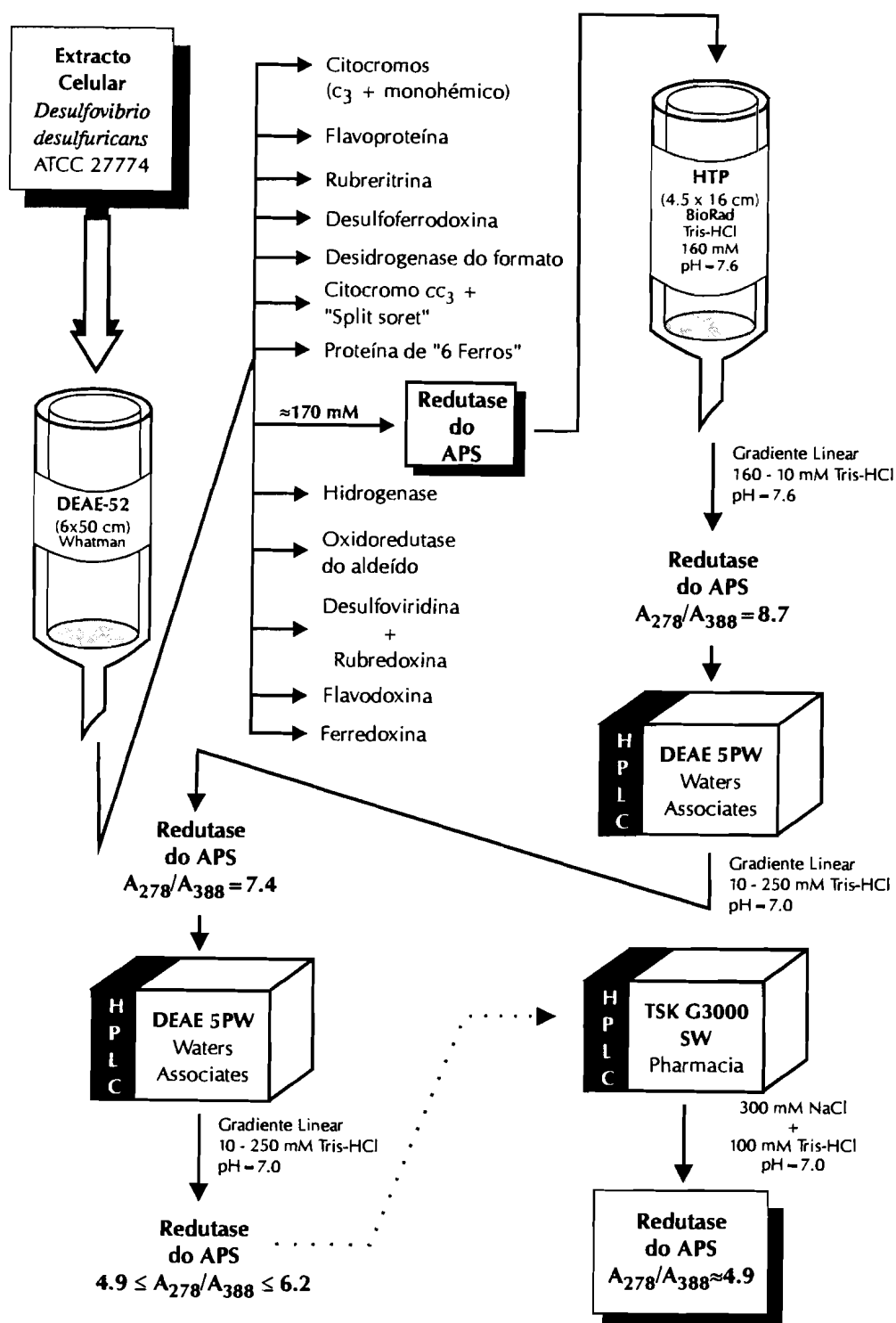


Figura IV.1. Esquema da purificação da redutase do APS da bactéria *D. desulfuricans* ATCC 27774.

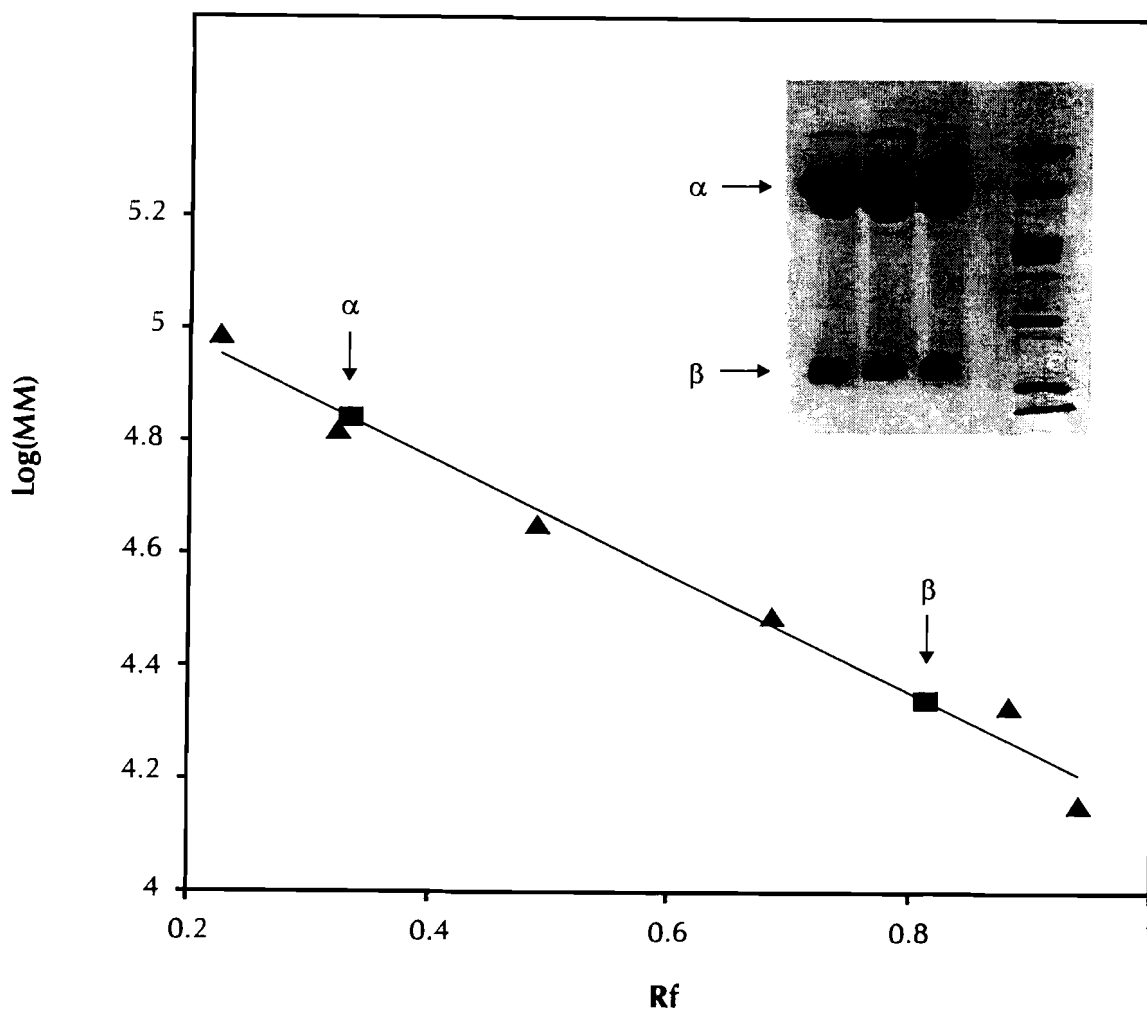


Figura IV.2. Determinação da composição e massa molecular das subunidades da redutase do APS de *D. desulfuricans*, em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 0.1% de SDS.

Para eliminar a possibilidade da existência de outras subunidades não detectáveis a esta concentração de acrilamida foi efectuado um gel de gradiente de concentração contínuo entre 5 e 20% em acrilamida. Não foram visualizadas quaisquer bandas para além das observadas no gel descontínuo a 12.5%.

A atribuição do arranjo estrutural das subunidades da redutase do APS tem sido alvo de alguma controvérsia (ver capítulo III, tabela III.1) devido ao erro associado à determinação da proteína pelos métodos disponíveis. No entanto, pensa-se que a estrutura mais provável seja do tipo $\alpha_2\beta$.

IV.3.3. Composição em ácidos aminados

A composição aproximada em ácidos aminados da redutase do APS foi determinada por hidrólise ácida, segundo o método de Moore e Stein (Apêndice A).⁵ Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela IV.1.

Tabela IV.1

*Composição aproximada dos ácidos aminados da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774*

Ácido aminado			
Asp + Asn	151	Ile	71
Tre	83	Leu	120
Ser	67	Tir	51
Glu + Gln	159	Fen	51
Gli	134	His	31
Ala	141	Lis	99
Cis	20	Arg	78
Val	100	Pro	78
Met	63	Trp	n.d.
Total de ácidos aminados - 1497			
Massa Molecular (Da) - 164670			

★ Os cálculos foram efectuados com base numa massa molecular de 165 kDa
n.d. - não determinado

IV.3.4. Sequência de ácidos amidos da região N-terminal das subunidades

A sequência de ácidos aminados da região N-terminal da subunidade maior (α) da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774, foi determinada num sequenciador automático, Applied Biosystem 477A, acoplado a um analisador de ácidos aminados, Applied Biosystem 120A, em membranas de PVDF (*Immobilon-P⁵⁰Q*). Após a separação das subunidades da redutase do APS de *D. desulfuricans*, por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 0.1% de SDS, procedeu-se à sua transferência para uma membrana de PVDF, através de um electrotransferidor (ver Apêndice A).^{6,7}

A visualização das bandas imobilizadas na membrana foi possível após coloração com Ponceau S. Depois de identificadas, as bandas das respectivas subunidades foram extraídas e secas ao ar. A subunidade maior (70 kDa) foi, depois, sujeita à degradação de Edman, *in situ*, no sequenciador. Deste modo, foi possível sequenciar os 24 primeiros ácidos aminados da subunidade maior da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774. A respectiva sequência é apresentada na Figura IV.3. A sequência obtida não revela homologias significativas quando comparada com as sequências registadas no banco de dados Swiss-Prot (28).

1				5					10
Pro	Lis	Ile	Pro	Ser	Lis	Glu	Tre	Pro	Arg
11				15					20
Gli	Val	Ala	Ile	Ala	Glu	(Pro)	(Tre)	Ile	()
21				25					
Val	Val	()	Leu	().					

Figura IV.3. Sequência N-terminal da subunidade maior da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

IV.3.5. Conteúdo em ferro

A espectroscopia de Emissão de Plasma revelou que o ferro é o único metal presente na redutase do APS purificada de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

O conteúdo em ferro foi analisado pelo método do TPTZ segundo Fisher e Price (Apêndice A).⁸ Verificou-se que a proteína contém 8 ± 1 átomos de ferro por molécula (ver Tabela IV.2). Os cálculos foram efectuados com base na concentração da proteína determinada pelo método de Lowry e por uma massa molecular de 165 kDa.⁹

Os resultados obtidos são concordantes com o observado pelas espectroscopias de RPE e Mössbauer (secções seguintes), que revelam a existência de dois agregados de ferro-enxofre do tipo [4Fe-4S]. O conteúdo em ferro determinado para a redutase do APS de *D. desulfuricans* é consistente com o verificado em todas as redutases descritas até à data, com a excepção da redutase do APS purificada da *Thiocapsa roseopersicina*, para a qual foi detectada a presença adicional de dois grupos hémicos por molécula de proteína.^{10,18}

Tabela IV.2

Valores obtidos para diferentes determinações do conteúdo em ferro na redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 2774

Amostra	Método de determinação do ferro ^①	
	TPTZ	Espectroscopia de Emissão de Plasma
I	8.77	8.3
II	9.04	8.6
III	6.83	7.5
IV	8.61	—
V	6.80	—
VI	7.45	—

① Os cálculos baseiam-se numa massa molecular de 165 kDa.

IV.3.6. Conteúdo em flavina

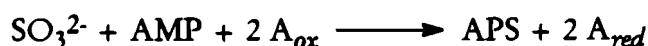
A concentração da flavina foi determinada segundo o método descrito por Rao e colaboradores em 1967.¹¹ O método baseia-se na solubilização da flavina, após precipitação da proteína com ácido tricloroacético (TCA) a 80%. Assim, à amostra de proteína (900 µl) adicionam-se 100 µl de TCA e agita-se. Remove-se a proteína por centrifugação a velocidade elevada e traça-se o espectro do sobrenadante. Usando um coeficiente de extinção molar, a 441 nm, igual a 11300 M⁻¹cm⁻¹, obteve-se uma concentração de 1.4 ± 0.3 flavinas por molécula.

Na Figura IV.4 mostra-se o espectro da flavina após precipitação da proteína com TCA. Por analogia com o observado em várias redutases do APS anteriormente descritas, sugere-se que a componente flavínica da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 seja do tipo FAD.^{12,13,17,18}

IV.4. Estudos cinéticos

IV.4.1. Determinação dos parâmetros cinéticos

O método usado para a determinação dos parâmetros cinéticos foi descrito por Bramlett e Peck.^{35,14} A actividade da redutase do APS é medida pela reacção inversa à naturalmente catalisada. A oxidação da molécula de sulfito na presença de AMP, é seguida indirectamente através da redução do aceitador electrónico, resultando na formação de APS. A equação seguinte mostra a reacção que ocorre no ensaio cinético:



em que A corresponde ao aceitador electrónico usado, tendo sido usados o ferricianeto de potássio e o citocromo c de coração de cavalo (Apêndice A).³⁵

Os parâmetros cinéticos relativos aos substratos naturais (AMP e sulfito) são determinados variando a concentração de cada um individualmente.

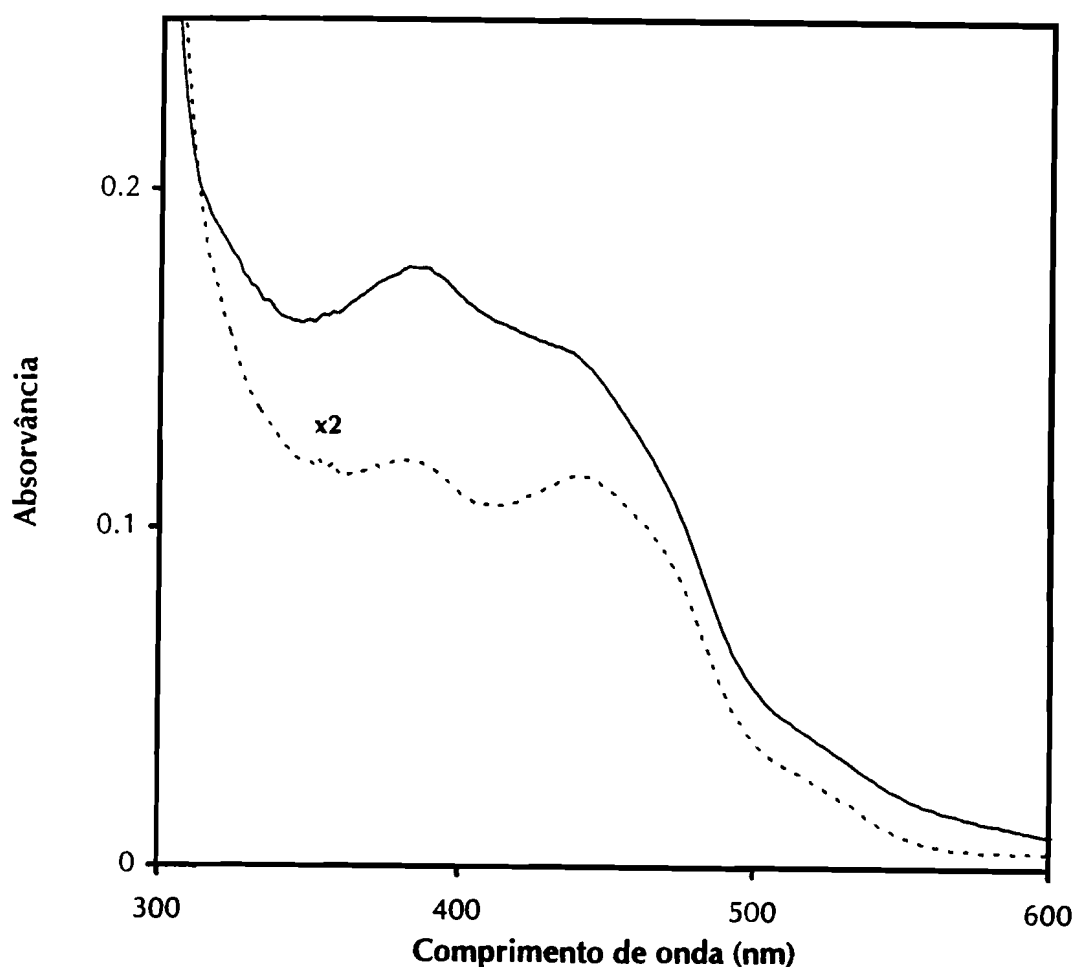


Figura IV.4. Espectro da flavina da redutase do APS, após precipitação da proteína com TCA. Enzima nativa, (—) e flavina solubilizada (---).

A representação gráfica da velocidade inicial de redução do aceitador, em função da concentração de cada substrato, revela uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos de afinidade da enzima para os substratos foram obtidos a partir da linearização de Lineweaver-Burk da equação de Michaelis-Menten.

Verificou-se que, em qualquer dos ensaios, a actividade da redutase do APS de *D. desulfuricans* depende da concentração dos substratos, AMP e sulfito. Na ausência de sulfito, a enzima não tem qualquer actividade, enquanto que sem AMP, a actividade específica da redutase decresce cerca de 90 %, quando comparada com o valor obtido nos ensaios com ambos os substratos. Pensa-se que a actividade observada nos ensaios sem

AMP, seja devida à presença de quantidades residuais deste nucleotídeo nas preparações usadas.

IV.4.1.1. Ferricianeto como aceitador de electrões

A actividade enzimática da redutase do APS foi seguida espectrofotometricamente na presença de ferricianeto de potássio, a pH 7.6, através da diminuição da absorvância a 420 nm.

A constante de afinidade (K_m) da enzima para o sulfito foi determinada usando uma concentração de AMP constante, igual a 3.3 mM. O valor de K_m obtido para o sulfito foi igual a 0.94 mM (Figura IV.5A). A uma concentração de sulfito constante de 3.0 mM, obteve-se um valor de K_m igual a 0.21 mM para o AMP (Figura IV.5B). A constante de afinidade da redutase do APS de *D. desulfuricans* para o sulfito é significativamente mais elevada do que o valor observado para a redutase de *D. gigas*, para a qual se obteve um valor igual a 0.34 mM.¹⁵

Os valores de K_m obtidos indicam que a actividade da enzima é mais dependente da concentração de sulfito do que de AMP, usando ferricianeto como aceitador electrónico.

A redutase do APS apresenta uma actividade específica de 2.12 unidades (uma unidade de actividade corresponde a 1 μ mole de APS produzido por minuto por miligrama de proteína). A actividade específica da redutase decresce ao longo do tempo, mesmo quando a proteína é mantida a -70 °C.

IV.4.1.2. Citocromo c como aceitador de electrões

Neste ensaio segue-se a redução do citocromo c, a pH 9.5, através do aumento da absorvância a 550 nm.

Usando uma concentração de sulfito igual a 0.33 mM, obteve-se um valor de K_m para o AMP igual a 0.129 mM. O K_m para o sulfito, calculado para uma concentração de AMP igual a 3.3 mM é igual a 0.074 mM.

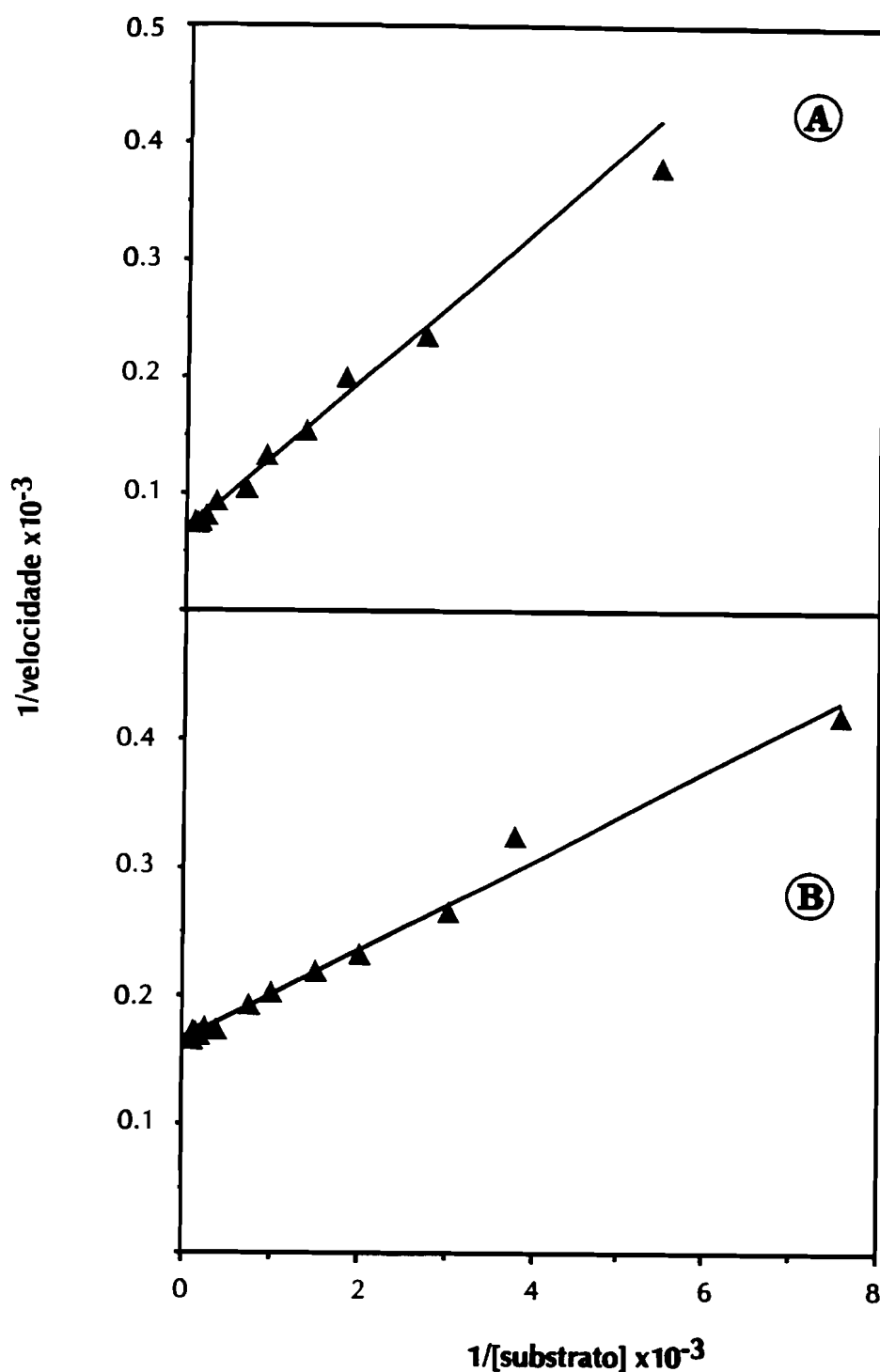


Figura IV.5. Determinação dos valores de K_m da redutase do APS de *D. desulfuricans* através da linearização de Lineweaver-Burk, usando ferricianeto como aceitador de electrões. (A) variação da concentração de sulfito e (B) variação da concentração de AMP. Obtiveram-se valores de K_m para o sulfito e AMP iguais a 0.94 mM e 0.21 mM, respectivamente.

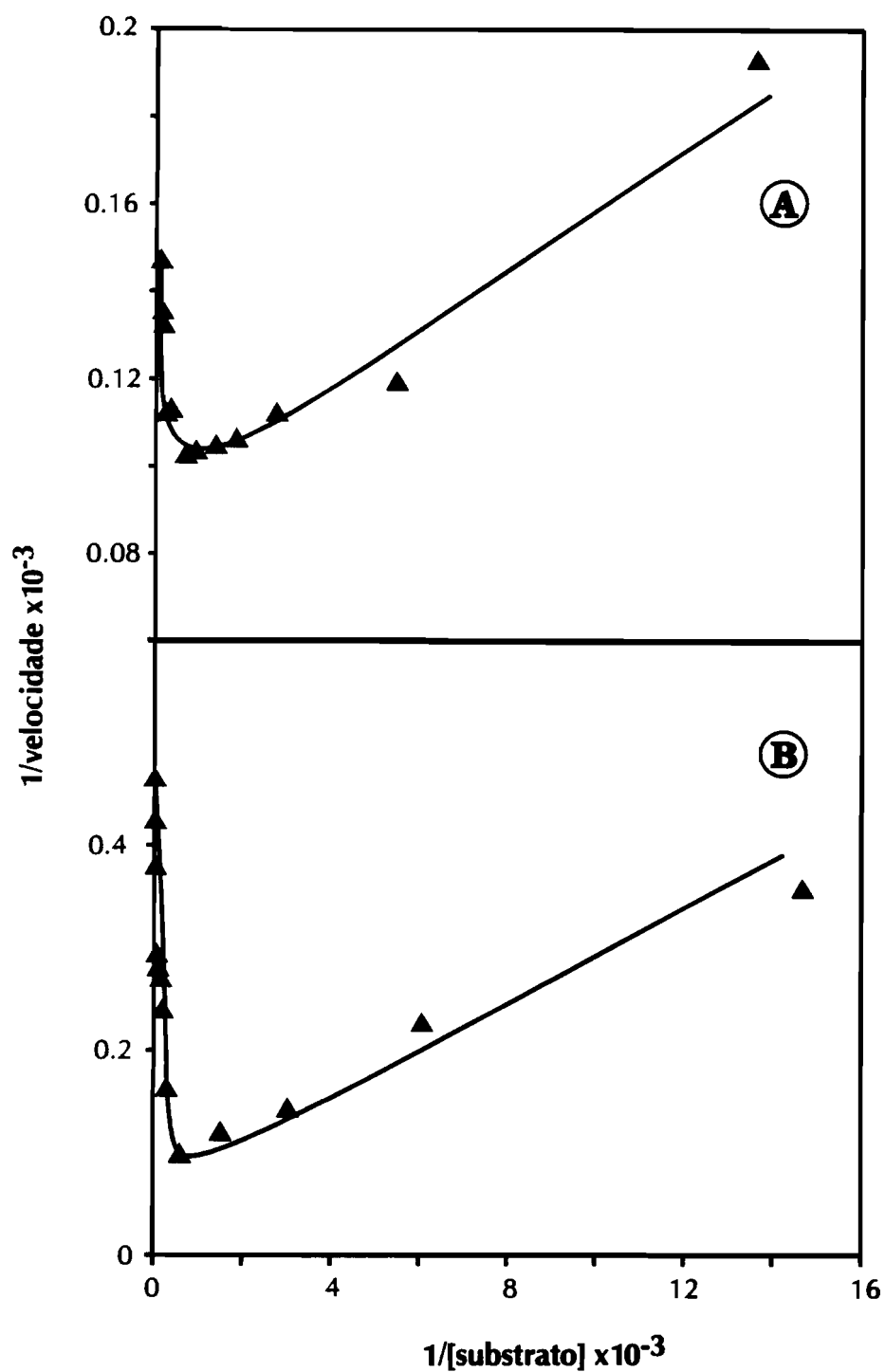


Figura IV.6. Determinação dos K_m da redutase do APS de *D. desulfuricans*, usando citocromo *c* de coração de cavalo como aceitador de electrões, através da linearização de Lineweaver-Burk. (A) O K_m para o sulfito é igual a 0.074 mM (concentração de AMP igual a 3.3 mM), e (B) K_m para o AMP é igual a 0.129 mM.

Os resultados apresentados na Figura IV.6 indicam que, na presença de citocromo *c*, a redutase do APS depende mais de AMP do que de sulfito, contrariamente ao observado no ensaio com ferricianeto. Por outro lado, observa-se que a concentrações elevadas, os substratos têm um efeito inibitório na actividade da enzima. No caso em que se varia a concentração de sulfito, verifica-se que, para concentrações inferiores a 1.5 mM, a dependência da actividade com a concentração de substratos segue uma reacção de primeira ordem, de acordo com a cinética de Michaelis-Menten. Para valores superiores a 1.5 mM, ocorre inibição pelo substrato. Quando se varia a concentração de AMP, o efeito inibitório observa-se para concentrações superiores a 2.1 mM.

Verifica-se também que a redutase do APS é mais activa na presença de ferricianeto do que de citocromo *c*. Os valores de K_m obtidos no ensaio com citocromo *c* são bastantes mais baixos do que os obtidos quando se usou ferricianeto. Estes resultados não estão de acordo com o observado por Bramlett e colaboradores, para a redutase do APS de *D. vulgaris*, a qual apresenta actividades da mesma ordem de grandeza usando ferricianeto ou citocromo *c* de coração de cavalo como aceitadores de electrões.³⁵ No entanto, o comportamento da redutase do APS de *D. desulfuricans*, na presença destes aceitadores de electrões, é semelhante ao obtido para a redutase isolada de *Desulfobulbus propionicus*.¹⁶

Na Tabela IV.3 apresentam-se, resumidamente, os parâmetros cinéticos para o AMP e o sulfito, na presença de ferricianeto e citocromo *c* de coração de cavalo.

IV.4.2. Determinação do $pH_{\text{óptimo}}$

A variação da actividade da redutase do APS em função do pH foi efectuada em tampão Tris-maleato (0.2 M), no ensaio com o ferricianeto e em tampão Tris-HCl (0.2 M) para o ensaio com o citocromo *c*, a diferentes pH, mantendo as concentrações de substratos constantes. O efeito do pH na actividade da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 está representado na Figura IV.7. A curva apresenta um perfil típico, em forma de sino.

Tabela IV.3

Valores de K_m para o AMP e o sulfito
para algumas redutases do APS na presença de ferricianeto e citocromo c

Organismo	K _m (mM)				Ref.
	Ferricianeto		Citocromo c		
	sulfito	AMP	sulfito	AMP	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 2774	0.94	0.21	0.074	0.129	★
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	2.0	0.30	0.24	0.18	35, 14
<i>Desulfohalobus propionicus</i>	1.3	0.09	0.071	0.091	16
<i>Thiobacillus thioparus</i>	2.5	0.10	0.0025	0.017	17
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	1.5	0.073	0.093	0.050	18

* Os dados obtidos fazem parte deste trabalho

A actividade máxima da redutase do APS de *D. desulfuricans*, na presença de ferricianeto, é atingida a um valor de pH aproximadamente igual a 7.5 (Figura IV.7A). Quando se usa citocromo c de cavalo como aceitador de electrões, a actividade máxima da redutase do APS é observada a pH=8.8 (Figura IV.7B). Os valores obtidos encontram-se compreendidos na gama de pH_{óptimo} geralmente observada para esta classe de enzimas, como se pode constatar na tabela III.1 do capítulo anterior.

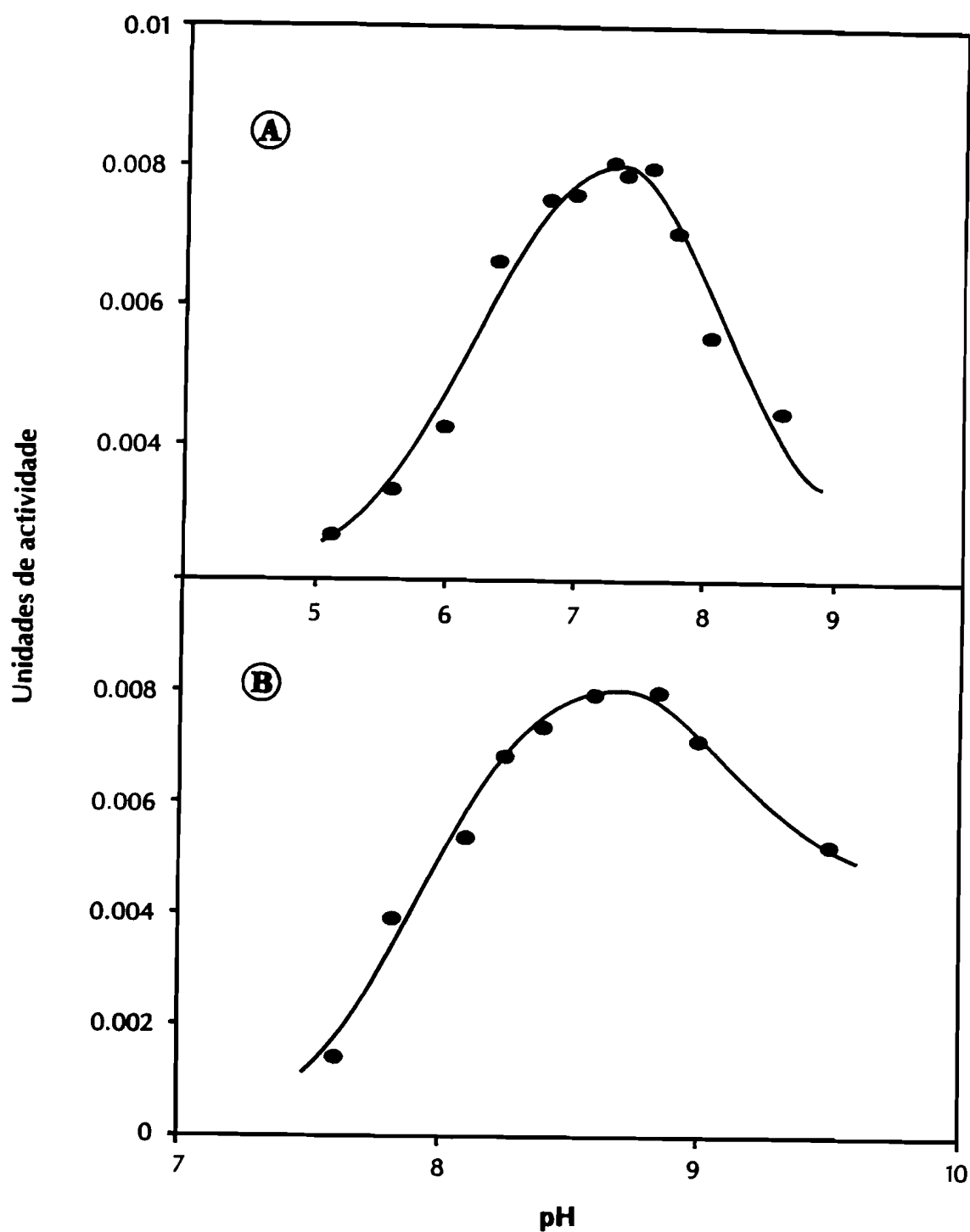


Figura IV.7. Determinação do $pH_{\text{ótimo}}$ da redutase do APS, na presença de: (A) ferricianeto de potássio (em tampão 0.2 M Tris-maleato) e (B) citocromo c de cavalo (em tampão 0.2 M Tris-HCl). Concentração de AMP e sulfito igual a 3.3 e 3.1 mM, respectivamente.

IV.4.3. Estabilidade da enzima. Reactivação da redutase do APS

A enzima redutase do APS revelou ser muito instável, catalítica e estruturalmente, ocorrendo desnaturação pouco tempo após a sua purificação. Ao longo do tempo de armazenamento, a actividade específica diminui drasticamente apresentando cerca de 90% de inactivação ao fim de menos de três meses, a -70 °C. O armazenamento da enzima a -20 °C origina a perda total da actividade após um mês, enquanto que à temperatura ambiente, a redutase do APS fica irreversivelmente inactiva ao fim de aproximadamente 12 horas.

Várias experiências foram efectuadas no sentido de tentar recuperar a actividade perdida durante o armazenamento. Para tal, uma amostra ~90% inactiva foi incubada, à temperatura ambiente, durante uma hora e meia na presença de vários reagentes. Foram usados compostos tiolados (β -mercaptoetanol e DTT) e um reagente oxidante (ferricianeto de potássio) na presença e ausência de oxigénio. Foi ainda testado o efeito da presença de hidrogenase/H₂ na reactivação da enzima.

Os resultados apresentados na Figura IV.8 revelam que a extensão da reactivação depende da presença ou não de oxigénio no ensaio. Verifica-se que as condições redutoras favorecem a reactivação, enquanto que em meios oxidantes a enzima é completamente inactivada. O máximo de reactivação, cerca de 50%, é obtido quando se incuba a redutase do APS com hidrogenase na presença de H₂, em condições anaeróbicas. No entanto, após reactivação a actividade decai subsequentemente, atingindo valores mínimos ao fim de 10 dias.

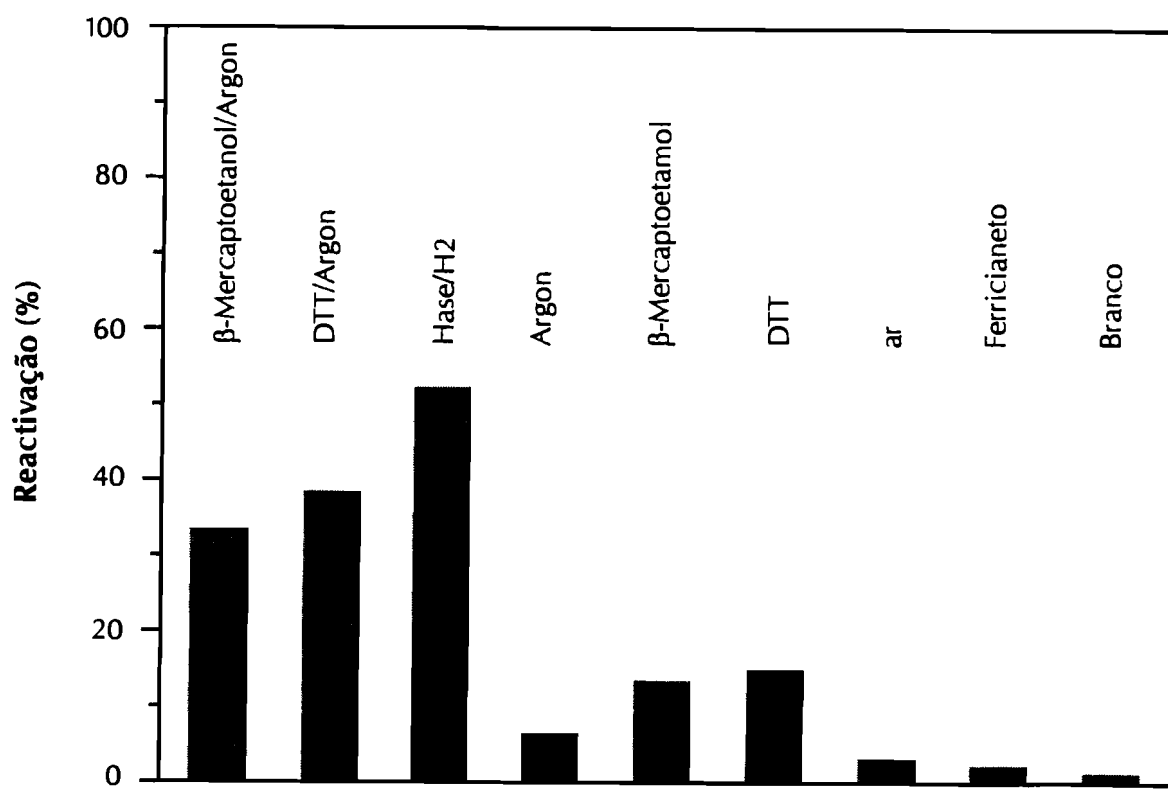


Figura IV.8. Reactivação da redutase do APS após inactivação por armazenamento.

A adição anaeróbica de DTT a uma amostra acabada de purificar não origina qualquer efeito na actividade específica da redutase do APS. Contrariamente, a incubação aeróbica da enzima com DTT causa inactivação parcial da redutase. É possível que a inactivação causada pelo DTT, sob condições aeróbicas, seja devida à redução do oxigénio até ao nível da H_2O_2 e subsequente reacção do H_2O_2 com a enzima, tal como foi observado na hidroxilase da fenilalanina.¹⁹

IV.5. Caracterização espectroscópica da redutase do APS

IV.5.1. Espectroscopia de UV/visível

O espectro de UV/visível da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 apresenta picos de absorção máxima a 278 e 388 nm, e ainda um "ombro" largo entre 475 e 420 nm (Figura IV.9). A forma do espectro é característica das redutases do APS conhecidas, apenas variando ligeiramente o pico de absorção máxima atribuído aos agregados ferro-enzofre, que pode ir de 375 nm para a redutase do APS de *D. vulgaris* Hildenborough a 394 nm para a redutase isolada de *Archeoglobus fulgidus*.^{35,20} O espectro global evidencia a presença de grupos flavínicos (475-420 nm) e de agregados de ferro-enzofre (388 nm), que conferem a cor castanho-amarelada à proteína.

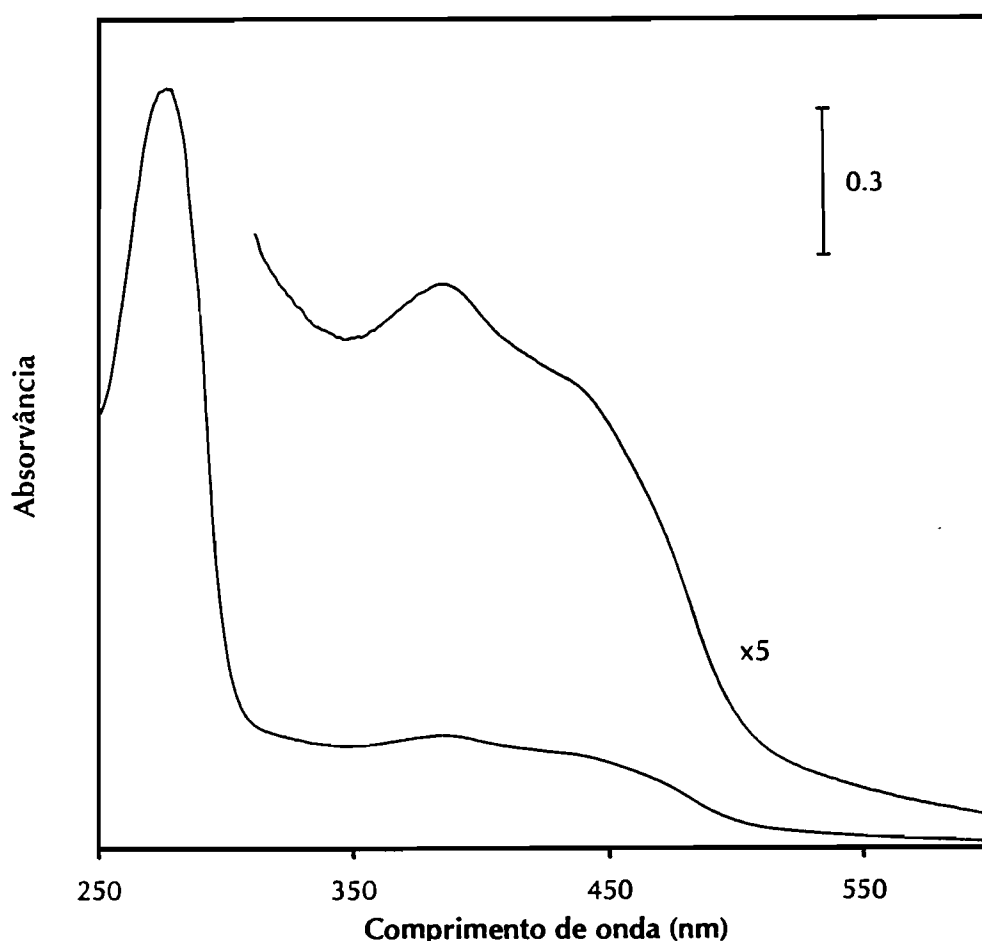


Figura IV.9. Espectro de UV/visível da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

O coeficiente de extinção molar, medido a 388 nm, foi calculado com base na concentração da proteína determinada pelo método de Lowry. Obteve-se um valor de $53800 \pm 3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este resultado está de acordo com o observado em redutases do APS anteriormente caracterizadas e é consistente com o conteúdo em ferro e em flavina. Cada átomo de ferro dos agregado ferro-enxofre apresenta um coeficiente de extinção molar aproximadamente igual a $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, enquanto que o grupo FAD contribui com cerca de $11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o que somado totaliza aproximadamente $50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

IV.5.2. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de visível

IV.5.2.1. Adição de sulfito e AMP à redutase do APS

A adição de sulfito a uma amostra de redutase do APS nativa origina uma diminuição acentuada da absorvância entre 500 e 340 nm e um ligeiro aumento entre 340 e 320 nm (Figura IV.10). O aumento da absorvância a 320 nm é consequência da formação de um aducto entre a flavina e a molécula de sulfito, que tem sido observado em outras flavoproteínas, como foi referido no capítulo III.^{21,22} O efeito da adição de sulfito à redutase do APS é bem visualizado pelo espectro de diferença entre o espectro de visível da enzima nativa e o da enzima reagida com sulfito (Figura IV.11A). O espectro resultante apresenta características típicas de um espectro de moléculas de FAD na forma reduzida, com picos máximos a 440 e 390 nm.²¹ A absorvância negativa à volta dos 320 nm constitui uma evidência inequívoca da interacção entre a molécula de sulfito e a flavina.²³

O comportamento da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é idêntico ao das redutases isolada de *D. vulgaris*³⁵, *D. gigas*¹⁵ e de *Thiobacillus denitrificans* (capítulo VI).

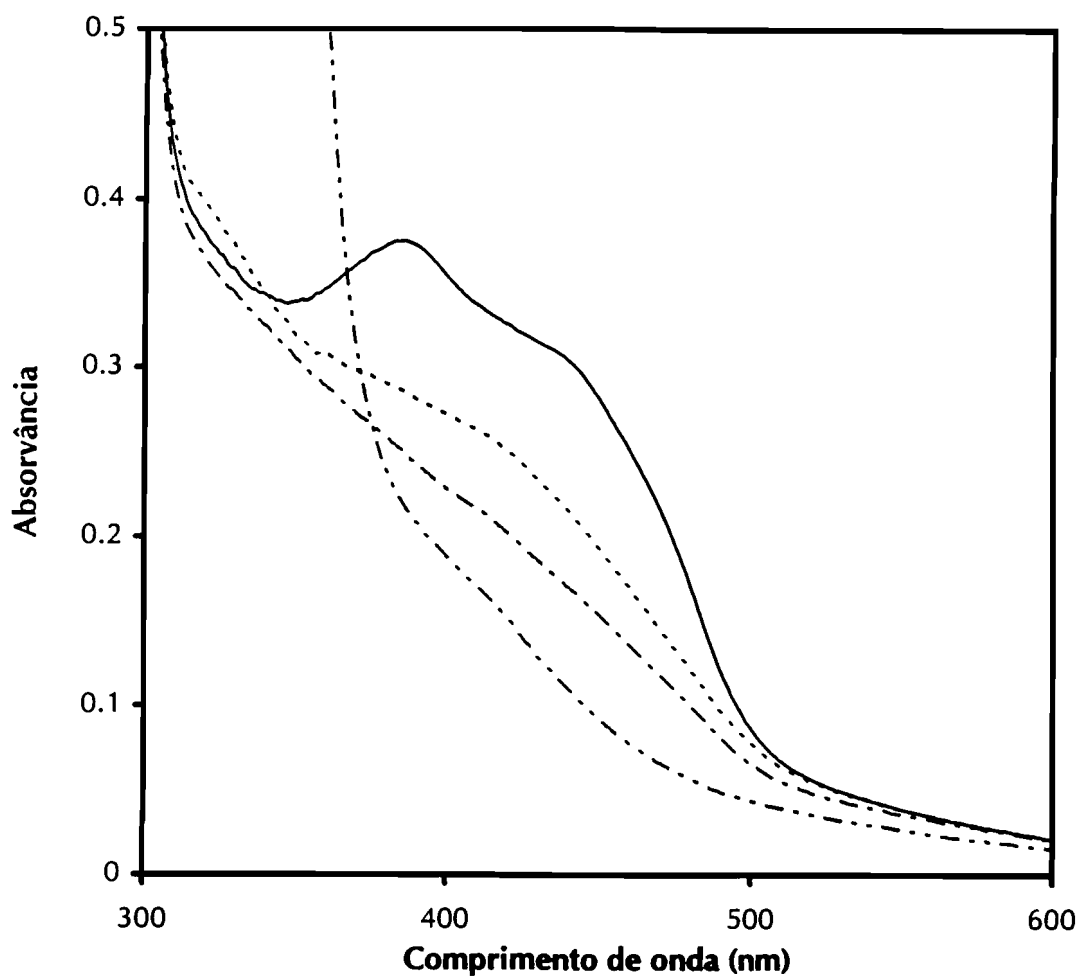


Figura IV.10. Efeito da adição dos substratos e de ditionito de sódio no espectro de visível da redutase do APS de *D. desulfuricans*. Enzima nativa (—); enzima reagida com sulfito (---); enzima reagida com sulfito e AMP (-.-.-); adição de ditionito de sódio à enzima incubada com sulfito e AMP (-.-.-.-).

Tal como na redutase do APS de *D. gigas*, a adição de AMP a uma amostra nativa da redutase de *D. desulfuricans* não origina alterações no seu espectro de visível. No entanto, se a reacção deste substrato com a enzima se efectuar na presença de sulfito, podem observar-se modificações significativas no espectro de visível da amostra (Figura IV.10). Neste caso, verifica-se uma diminuição global da absorvância na região do visível, inclusive a 320 nm.

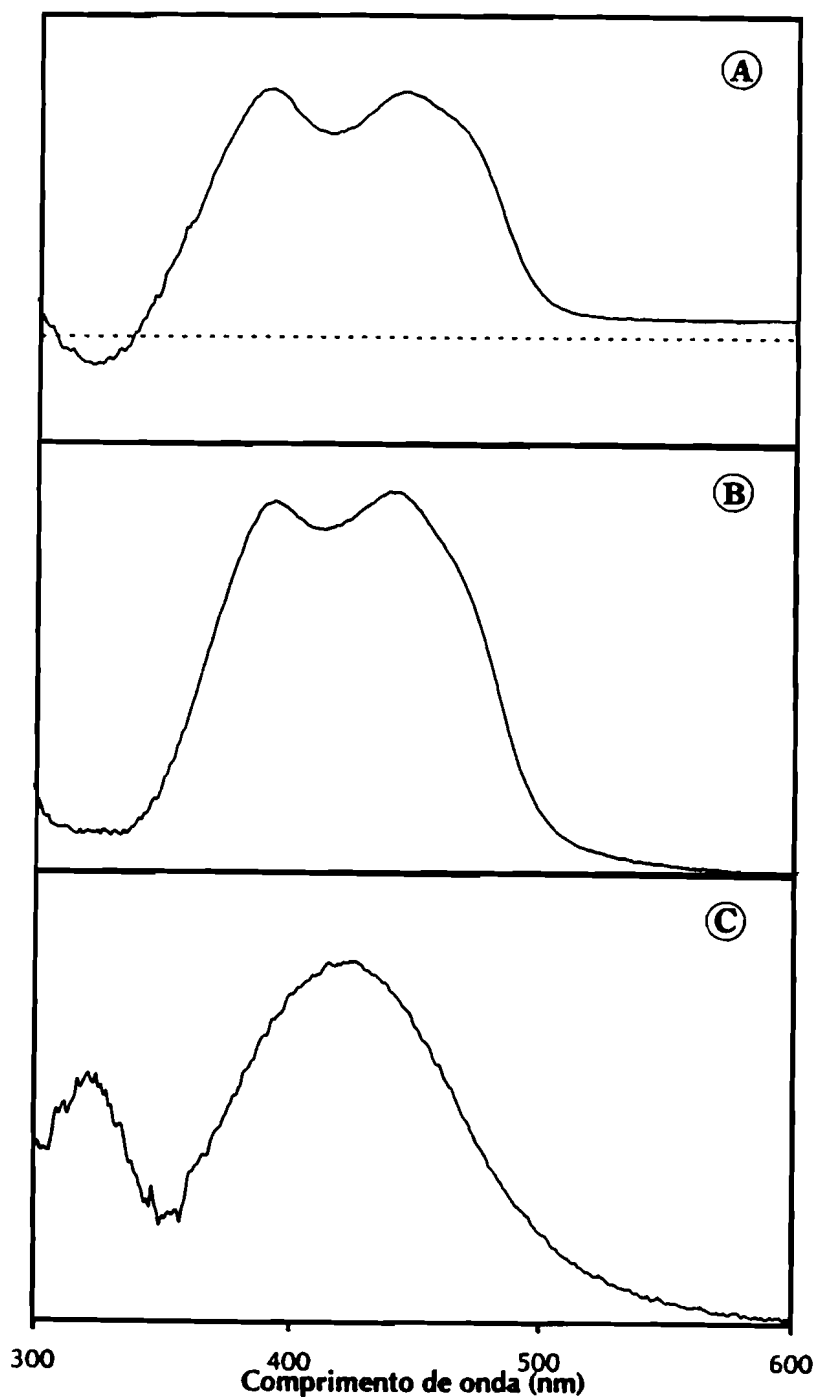


Figura IV.11. Espectros de diferença entre a redutase do APS nativa e reagida com os substratos. (A) enzima nativa menos enzima reagida com sulfito; (B) enzima nativa menos enzima reagida com sulfito e AMP; e (C) enzima reagida com sulfito menos enzima reagida com sulfito e AMP.

O espectro de diferença obtido a partir da enzima nativa contra a enzima reagida com sulfito e AMP (Figura IV.11B), bem com o da diferença entre a enzima mais sulfito e a enzima com sulfito e AMP (Figura IV.11C) mostram que, para além da flavina, a enzima possui agregados ferro-enxofre como grupos prostéticos.

Da análise dos espectros resultantes da adição dos substratos à redutase do APS, poderá dizer-se que na presença de sulfito, o AMP facilita a redução dos agregados $[4\text{Fe-4S}]$ presentes na redutase.

IV.5.2.2. Adição de ditionito de sódio à redutase do APS

A adição de ditionito de sódio à redutase do APS reagida com sulfito e AMP provoca uma segunda diminuição geral da absorvância do espectro de visível, que é atribuída à redução total dos cromóforos (Figura IV.10).

IV.5.3. Espectroscopia de RPE

O espectro de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* no estado nativo, adquirido a 8 K, apresenta um sinal com pouca intensidade, centrado a $g=2.025$ (Figura IV.12A). Este sinal tem uma forma quase isotrópica, sendo normalmente observado em proteínas que contêm agregados do tipo $[3\text{Fe-4S}]$ na forma oxidada ($S=1/2$), tal como a ferredoxina II de *D. gigas*.²⁴ A concentração, em spins, do sinal observado varia de amostra para amostra. Contudo, a sua concentração nunca foi superior a 0.2 spins por molécula.

A dependência da intensidade do sinal da amostra nativa com a temperatura, mostra que este sinal não é detectável a valores superiores a 30-35 K, o que apoia a atribuição deste sinal a um agregado $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$, no estado oxidado.

IV.5.4. Efeito da adição de substratos e redutores no espectro de RPE

IV.5.4.1. Adição de AMP e sulfito

Tal como no espectro de visível, a adição dos substratos à redutase do APS de *D. desulfuricans* origina alterações significativas no espectro de RPE da enzima. A adição sequencial de AMP e sulfito possibilita a identificação dos centros envolvidos na catálise enzimática.

Deste modo, a enzima foi incubada com AMP e, tal como observado no espectro de visível, este nucleotídeo não provoca modificações no espectro de RPE da enzima nativa. A adição de sulfito induz o aparecimento de um segundo sinal de RPE, com uma intensidade bastante baixa, apesar de originar alterações drásticas no espectro de UV/visível da proteína nativa (Figura IV.12B). A sua intensidade depende da amostra estando, provavelmente, relacionada com a presença de quantidades mínimas de AMP endógeno. A quantificação desta espécie resulta num valor de 0.20 ± 0.05 spins por molécula. A adição posterior de AMP a uma amostra reagida com sulfito causa alterações significativas no espectro de RPE da redutase do APS. Verifica-se um aumento da intensidade do sinal rômboico anteriormente observado e a diminuição da intensidade do sinal "isotrópico" a $g=2.025$ (Figura IV.12C). O sinal rômboico é caracterizado por valores de g iguais a 2.096, 1.939 e 1.891, estando normalmente associado a agregados [4Fe-4S] no estado reduzido (geralmente denominado por sinal do tipo " $g=1.94$ "). A largura das linhas deste sinal é igual a 57, 48 e 24 G, respectivamente. A sua quantificação indica que esta espécie representa 0.40 ± 0.05 spins por molécula. Este resultado demonstra que a molécula de AMP interactua, de algum modo, com um dos agregados [4Fe-4S] presentes na redutase do APS. Esta interacção parecer favorecer a redução parcial do mesmo agregado, na medida em que a intensidade do sinal observado quando da adição de sulfito aumenta significativamente.

A adição do nucleotídeo APS à enzima não tem qualquer efeito no espectro de RPE desta.

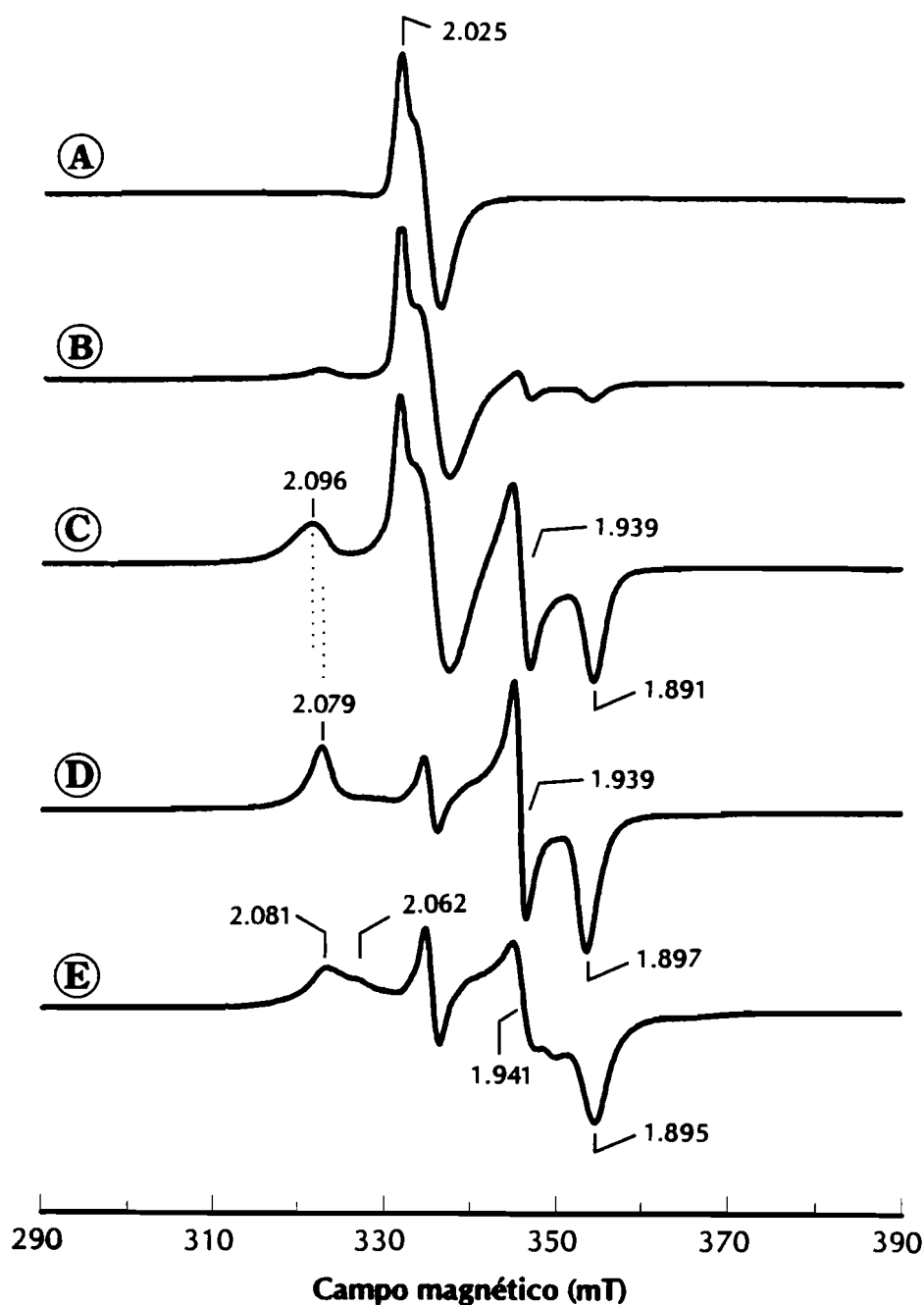


Figura IV.12. Espectros de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* em diferentes estados de oxidação. (A) enzima nativa; (B) enzima reagida com sulfito; (C) enzima reagida com sulfito e AMP; (D) enzima parcialmente reduzida com ditionito de sódio durante menos de um minuto (0.1 M em Tris-HCl, pH ~ 9.0) e (E) enzima totalmente reduzida com ditionito de sódio, trinta minutos de incubação. Condições experimentais: temperatura, 8 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 6.3×10^4 e 4×10^4 (E).

Os resultados obtidos pela adição dos vários substratos são idênticos aos observados anteriormente por Lampreia e colaboradores na redutase de *D. gigas* e na enzima isolada da arqueobactéria *Archeoglobus fulgidus*.^{15,20}

IV.5.4.2. Redução parcial da redutase do APS

Este estado de oxidação da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é obtido por redução rápida (menor do que um minuto) da enzima com ditionito de sódio (0.1 M em tampão Tris-HCl, pH~9.5). Neste estado, o espectro de RPE é caracterizado por uma única espécie com valores de g iguais a 2.079, 1.939 e 1.897 (Figura IV.12D). Paralelamente, verifica-se o desaparecimento total do sinal "isotrópico" observado no espectro da proteína nativa, devido à redução total do agregado $[3Fe-4S]^{1+}$. A dependência da temperatura, bem como os parâmetros de RPE da espécie detectada são característicos de um agregado $[4Fe-4S]$ na forma reduzida.

A comparação do sinal observado quando da redução da enzima com ditionito ($t < 1$ min.) com o obtido pela adição dos substratos (sulfito e AMP), indica que ambos os sinais provêm do mesmo centro, pelo facto de se observarem apenas pequenas modificações na posição do sinal e na largura de linha do pico a campo mais baixo. A este centro deu-se o nome de centro I da redutase do APS. A sua quantificação indica que o centro I representa 1.0 ± 0.15 spins por molécula.

Por analogia com a redutase do APS de *D. gigas*, e com base na quantificação do sinal e em dados de Mössbauer, sabe-se que neste estado, a enzima encontra-se 50% reduzida.

A redução parcial da enzima pode ser, também, obtida pela incubação da enzima com hidrogenase/ H_2 , em condições anaeróbicas. O espectro de RPE resultante apresenta um sinal idêntico ao obtido pela redução parcial com ditionito de sódio (Figura IV.13).

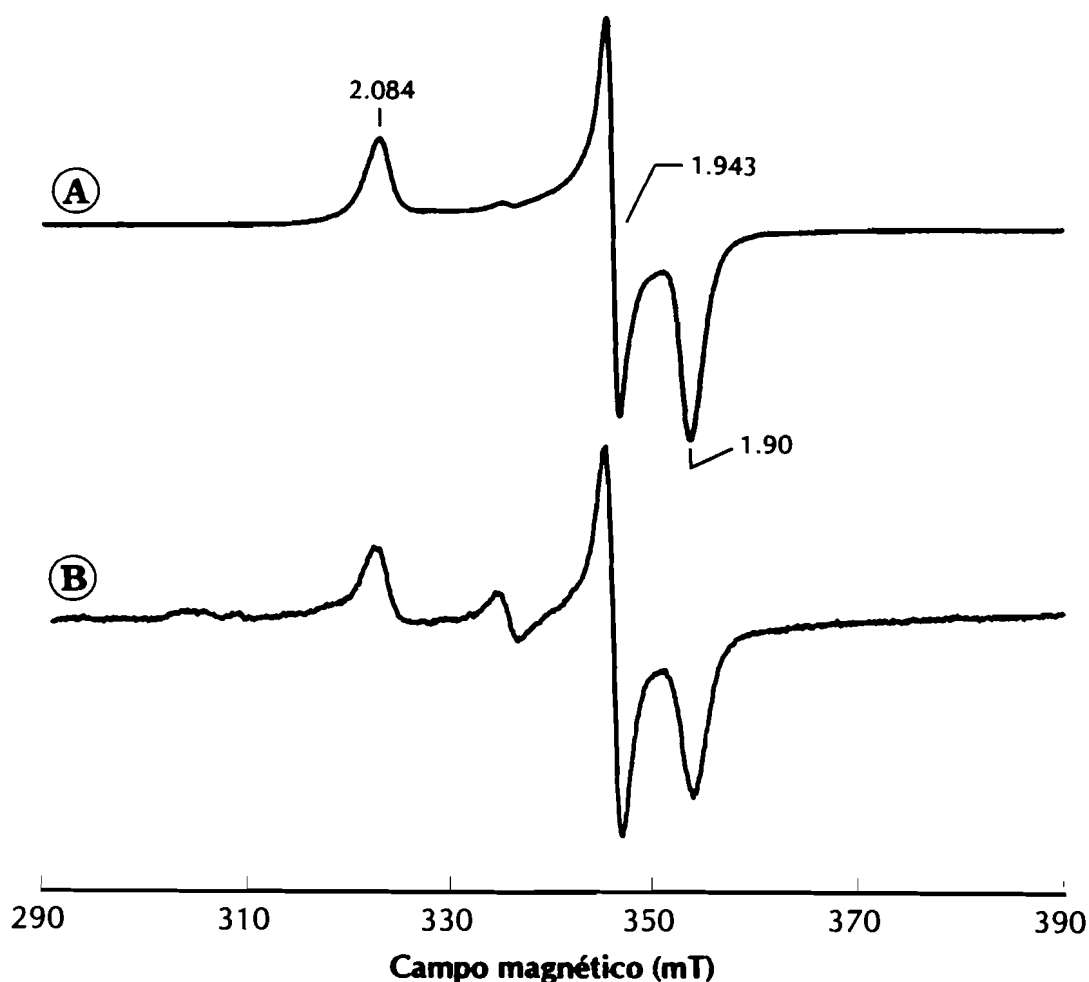


Figura IV.13. Espectros de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774, parcialmente reduzida com ditionito de sódio (A) e hidrogenase/H₂ (B). Condições experimentais: concentração da amostra A, 185 μ M e B, 170 μ M; temperatura, 8K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho do espectro (A), 1.25×10^4 , espectro (B) 4×10^4 .

IV.5.4.3. Redução total da redutase do APS

A redução total da enzima só é conseguida após redução com ditionito de sódio a $\text{pH} \geq 9.0$ e durante um longo período de incubação (maior do que 15 minutos). Por totalmente reduzida entende-se o máximo de redução possível de se obter nas condições experimentais efectuadas. O espectro de RPE da enzima totalmente reduzida exhibe um sinal

bastante complexo (Figura IV.12E). Este tipo de sinal está normalmente associado a proteínas que contêm agregados ferro-enxofre em interacção magnética.²⁵ A integração deste sinal de interacção originou um valor de 1.45 ± 0.2 spins por molécula. Assim, tendo em conta a quantificação em spins da amostra totalmente reduzida e a presença de um sinal de interacção no espectro de RPE, poder-se-á dizer que a redutase do APS possui, no mínimo, um segundo agregado de ferro-enxofre. Este agregado foi denominado centro II da redutase do APS.

Da comparação dos resultados obtidos pela aplicação da espectroscopia de Mössbauer (secção seguinte), com o descrito para a redutase de *D. gigas* e tendo em conta o conteúdo em ferro, concluiu-se que o segundo agregado ferro-enxofre referido seja do tipo [4Fe-4S].

A dependência da temperatura do sinal de RPE da enzima totalmente reduzida mostra que a interacção entre os centro I e II, deixa de existir a temperaturas entre 20 e 25 K, sendo possível observar, para valores superiores, apenas o sinal rômico atribuído ao centro I (Figura IV.14).

De salientar ainda, que durante o processo de redução da redutase do APS nunca foi detectado um sinal radicalar a $g \sim 2.00$ que estaria associado à formação de uma semi-quinona devida à redução mono-electrónica da flavina.

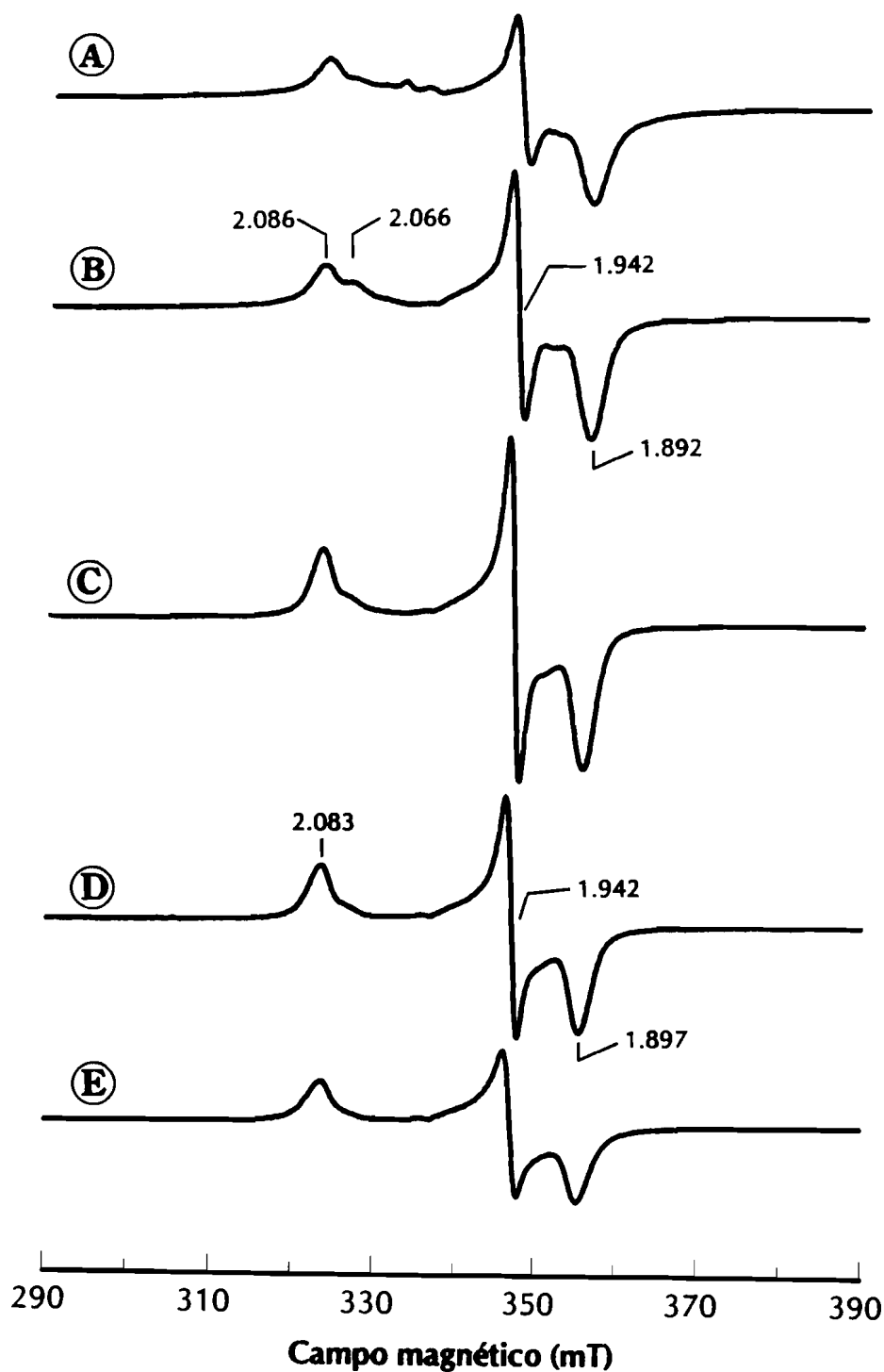


Figura IV.14. Dependência da temperatura do sinal de RPE da redutase do APS no estado totalmente reduzido, obtido por redução longa com ditionito de sódio. Condições experimentais: temperatura, 8 (A); 12 (B); 18 (C); 22 (D) e 25 (E) K; frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .

IV.5.5. Espectroscopia de Mössbauer

O espectro de Mössbauer da amostra nativa, adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado, paralelo ao feixe de radiação γ , de 500 G (Figura IV.15A) é aparentemente constituído por um dobleto de quadrupolo com linhas bastante alargadas, revelando "ombros" na parte interna do espectro. Estas características espectrais são muito semelhantes às observadas para a redutase do APS purificada de *D. gigas*. Tendo em conta este facto, e em conjugação com os dados obtidos por RPE atrás discutidos, pode-se afirmar que estamos na presença de uma espécie diamagnética (i.e., $S = 0$). Numa tentativa de proceder à análise deste espectro foi efectuado o ajuste assumindo quatro diferentes dobletos de quadrupolo com igual intensidade. Os resultados obtidos (apresentados na Tabela IV.4) são característicos de agregados $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

Tabela IV.4

*Parâmetros obtidos do ajuste do espectro de Mössbauer da amostra nativa da redutase do APS de *D. desulfuricans* adquirido a 4.2K*

Dobleto	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	Γ (mm/s)
1	0.47 ± 0.03	1.46 ± 0.02	0.27
2	0.47 ± 0.03	1.29 ± 0.02	0.26
3	0.47 ± 0.03	1.10 ± 0.02	0.35
4	0.43 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.35

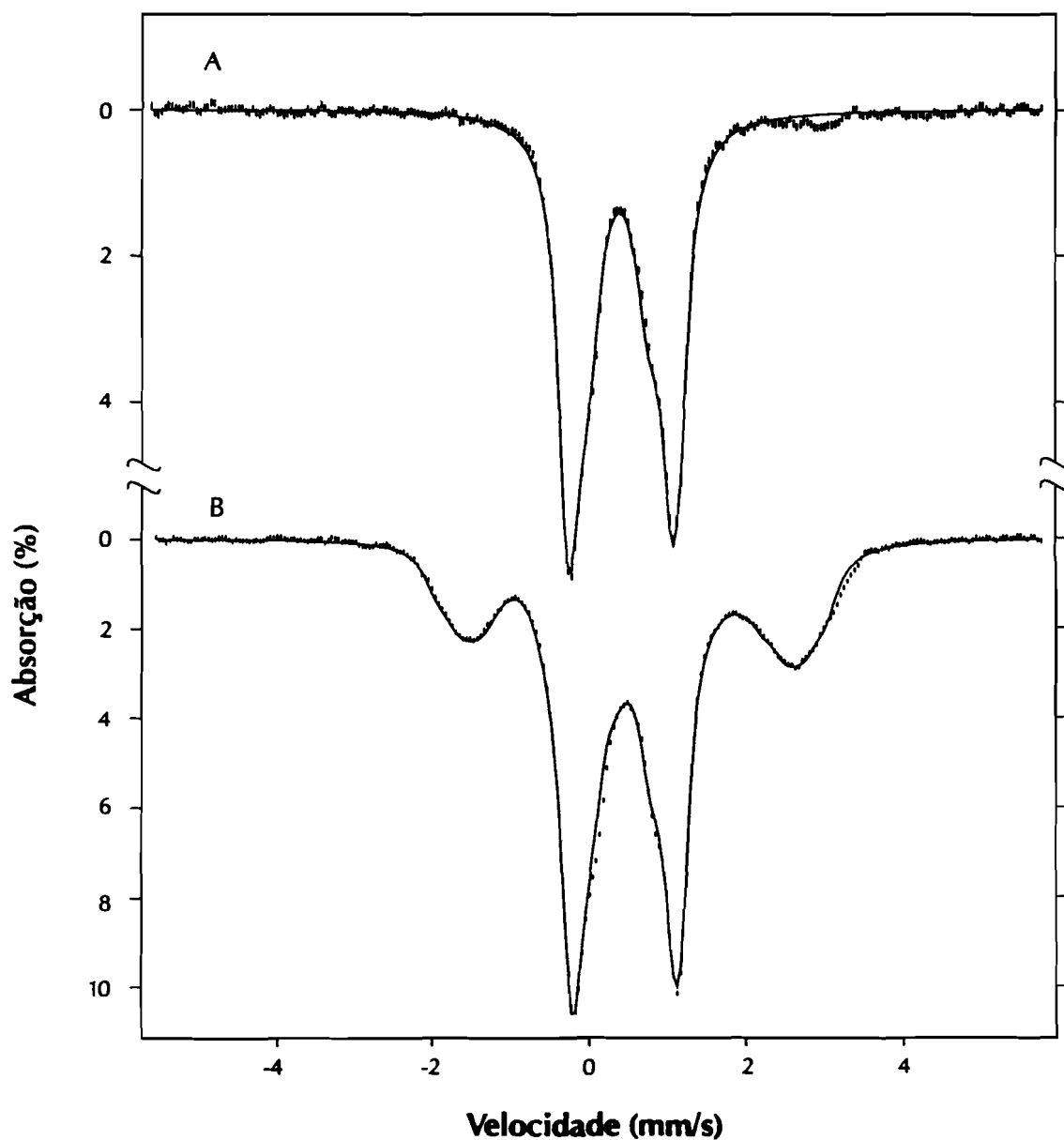


Figura IV.15. Espectros de Mössbauer da redutase do APS isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774 adquiridos na presença de um campo magnético aplicado (paralelamente ao feixe de radiação γ) de 500 G. (A) forma nativa e (B) após redução com ditionito de sódio (15 segundos).

Na Figura IV.15B apresenta-se o espectro obtido após redução com ditionito de sódio durante 15 segundos. O espectro foi adquirido a 4.2 K na presença de um campo magnético aplicado, paralelo ao feixe de radiação γ , de 500 G. Para além do duplete de quadrupolo observado na amostra nativa, o espectro é agora constituído também por uma espécie magnética com picos de absorção entre aproximadamente -1.5 mm/s e +2.5 mm/s. Para a análise desta nova componente espectral subtraíram-se 51% do duplete de quadrupolo central, usando os parâmetros obtidos para a amostra nativa. O espectro resultante é mostrado na Figura IV.16. Este espectro foi, então, simulado assumindo duas componentes distintas (correspondentes a dois sítios de ferro não equivalentes) e utilizando o seguinte Hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = g_e \beta_e \mathbf{H} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{S} \cdot \tilde{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{I} - g_n \beta_n \mathbf{H} \cdot \mathbf{I} + \frac{eQV_z}{12} \left[3I_z^2 - \frac{15}{4} + \eta(I_x^2 - I_y^2) \right]$$

Os dois sítios partilham o mesmo tensor g , mas possuem tensores de acoplamento hiperfino (A) e de gradiente de campo eléctrico (V) distintos.

Os parâmetros obtidos (Tabela IV.5) são semelhantes aos descritos para a redutase do APS de *D. gigas* e são característicos de um agregado $[4\text{Fe-4S}]^+$. Da análise dos resultados, pode salientar-se que uma das componentes (denominada sítio 1) possui um maior carácter ferroso, enquanto que outra (denominada sítio 2) tem características férricas. Também, e como seria de esperar para um sistema acoplado, os sítios 1 e 2 possuem campos internos de sinais contrários. Na sua totalidade, estas componentes contribuem com cerca de 41% para a absorção total do espectro. De referir ainda que os valores de ΔE_Q e δ obtidos para o sítio 1 são ligeiramente superiores aos obtidos para outros agregados do tipo $[4\text{Fe-4S}]$. Uma possível justificação para este facto é a de um dos átomos de ferro possuir uma esfera de coordenação na qual se inclui pelo menos um ligando não sulfurado.

Os restantes 8% da absorção total podem ser atribuídos a um duplete de quadrupolo com $\Delta E_Q = 3.25 \pm 0.02$ mm/s, $\delta = 1.38 \pm 0.02$ mm/s e $\Gamma = 0.4$ mm/s. Estes parâmetros são típicos de ferro ferroso adventício.

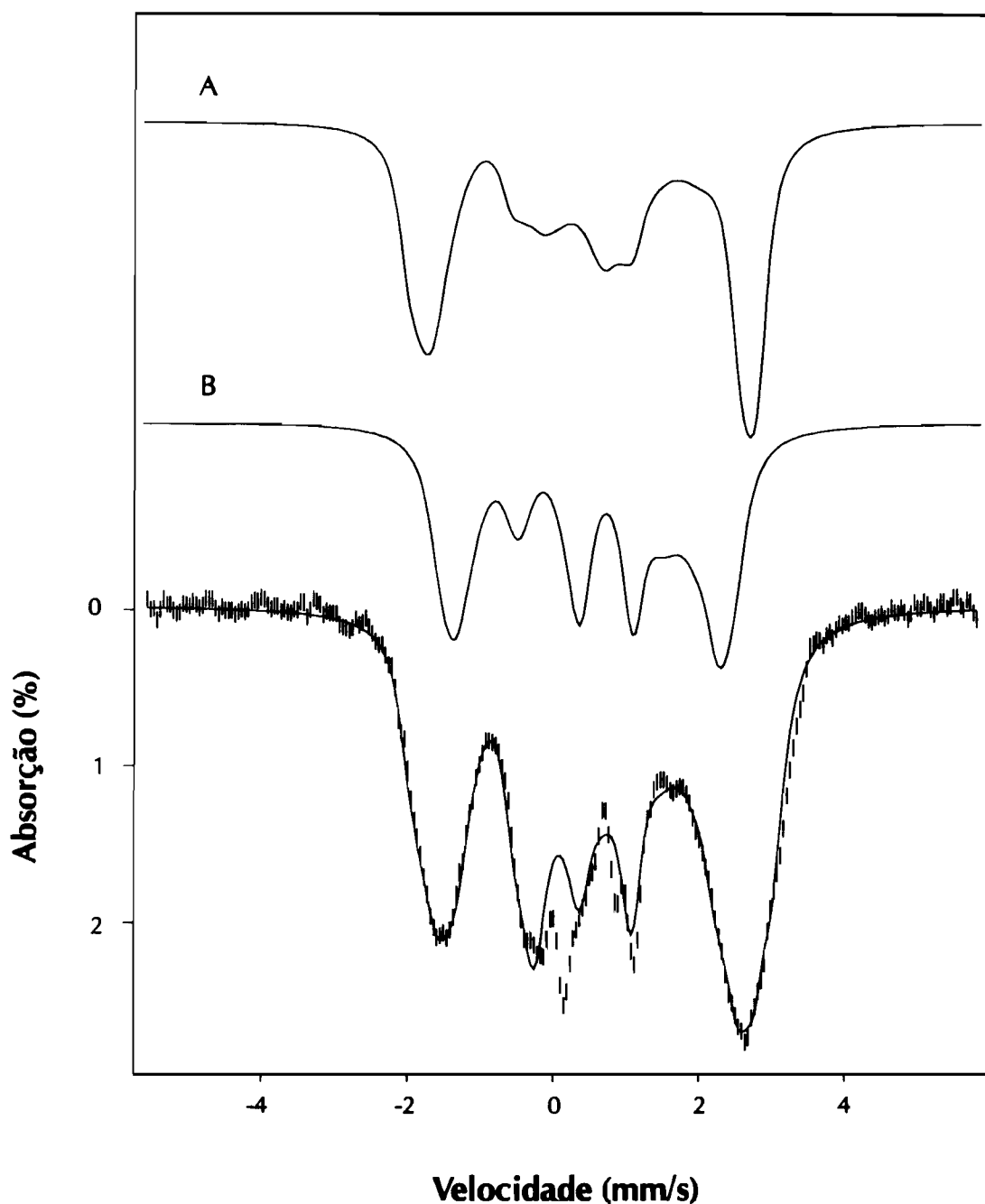


Figura IV.16. Espectro de Mössbauer do centro I da redutase do APS isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774, obtido por subtração de 51% do espectro presente na amostra nativa. A linha sobreposta ao espectro experimental é constituída pela soma de 20.5% da simulação obtida para o sítio 1, 20.5% da simulação obtida para o sítio 2 e 8% de um duplete de quadrupolo com $\Delta E_Q = 3.25 \pm 0.02$ mm/s, $\delta = 1.38 \pm 0.02$ mm/s. No topo da figura apresentam-se as simulações obtidas para o sítio 1 (A) e para o sítio 2 (B).

Tabela IV.5

Parâmetros obtidos para a simulação do espectro de Mössbauer da amostra semi-reduzida

	Sítio 1	Sítio 2
ΔE_Q (mm/s)	2.06 ± 0.05	1.34 ± 0.05
δ (mm/s)	0.61 ± 0.02	0.55 ± 0.03
A_{xx} (kG)	118 ± 10	-228 ± 10
A_{yy} (kG)	122 ± 10	-253 ± 10
A_{zz} (kG)	69 ± 10	-204 ± 10
η	0.46	0.57
Γ (mm/s)	0.36	0.31

Estes resultados vêm apoiar a existência de dois agregados de [4Fe-4S] na redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774. Na amostra nativa ambos se encontram no estado oxidado, diamagnético, contribuindo para o espectro de Mössbauer na forma de doubletos de quadrupolo. Por redução com ditionito de sódio (15 segundos) um dos agregados é reduzido. Com efeito poderá dizer-se que este agregado, anteriormente denominado por centro I, se encontra 90% no estado reduzido. Este resultado é importante pois as correspondentes amostras de RPE apresentam um único conjunto de ressonâncias, que quantificam aproximadamente 1 spin/molécula.

IV.6. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS

Os potenciais de oxidação-redução dos centros activos da redutase do APS foram determinados por titulações potenciométricas, acopladas às espectroscopias de UV/visível e RPE, na presença de mediadores electrónicos (ver Apêndice A). As titulações potenciométricas da redutase foram efectuadas por adição de redutores químicos, tais como o ditionito de sódio ou metilo de viologénio reduzido com zinco. No sentido de avaliar a capacidade redutora do sulfito, uma vez que se observou espectroscopicamente que este substrato reduzia totalmente a flavina e parcialmente o centro I, foram feitas titulações potenciométricas seguidas pela espectroscopia de UV/visível.

Verificou-se que o uso de diferentes agentes redutores não afecta os potenciais de oxidação-redução dos vários centros activos da redutase.

IV.6.1. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de UV/visível

A redução da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774, em tampão 50 mM Tris-HCl a pH 8.0, é seguida pela diminuição da absorvância a 388 e a 440 nm, comprimentos de onda de absorção máxima dos agregados ferro-enxofre e da flavina, respectivamente.

Por adição de ditionito de sódio (0.2 M de ditionito em 0.1 M Tris-HCl, pH ~9.0) conseguiu-se uma variação do potencial de oxidação-redução entre 250 e -440 mV. Após a normalização dos dados experimentais, sobrepuseram-se-lhes curvas de Nernst teóricas, estimando-se deste modo, os valores dos potenciais associados a cada transição de oxidação-redução. As curvas de Nernst resultantes da representação gráfica do potencial de oxidação-redução em função da percentagem de redução, medida a 388 e 440 nm, estão representadas na Figura IV.17. O perfil global das curvas de titulação medidas aos dois comprimentos de onda, é muito semelhante. Em ambas podem detectar-se duas transições de oxidação-redução, bem definidas, e o aparecimento de uma terceira para valores de potencial inferiores a -300 mV.

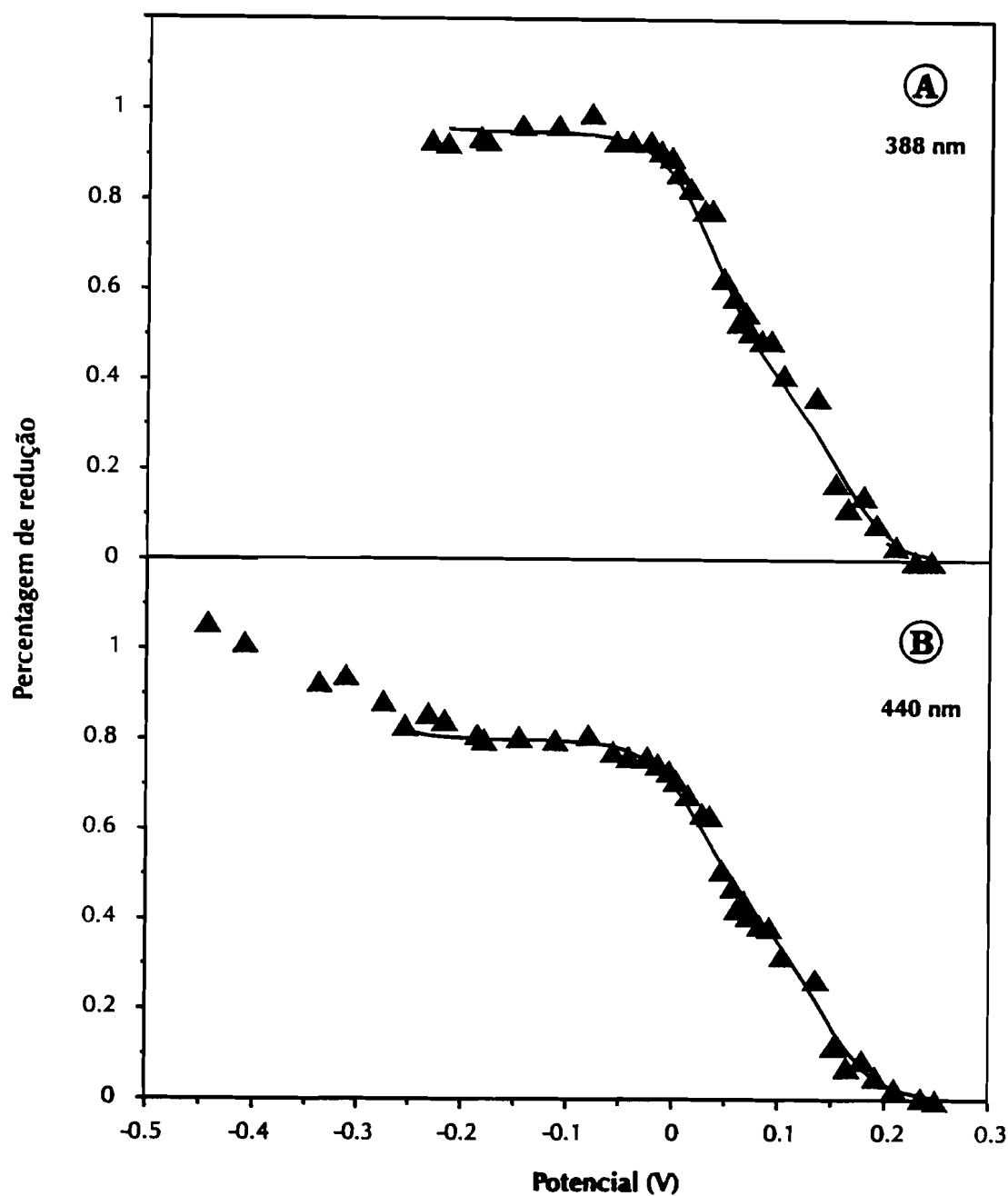


Figura IV.17. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de *D. desulfuricans*, por titulação potenciométrica com ditionito de sódio (0.2 M de ditionito de sódio em 0.1 M Tris-HCl, pH ~9.0) seguida por UV/visível. (A) variação da absorvância a 388 nm e (B) variação da absorvância a 440 nm. As curvas sobrepostas representam o ajuste dos pontos experimentais usando equações de Nernst.

A primeira transição foi ajustada como sendo um processo bi-electrónico ($n=2$), com um potencial de oxidação-redução igual a 147 ± 3 mV. Este processo de oxidação-redução é explicado em termos da redução do grupo FAD à forma FADH₂, sem formação de uma semiquinona, o que está de acordo com o facto de nunca ter sido possível detectar um sinal radicalar no espectro de RPE. Com base nestes resultados pode concluir-se, então, que a forma semiquinona não é estabilizada durante o processo de redução da flavina. No entanto, verifica-se que o valor obtido é relativamente elevado para proteínas que contêm flavinas, podendo estar associado à formação do aducto com a molécula de sulfito.²⁶ A segunda transição é atribuída à redução mono-electrónica do centro I, a qual ocorre a um potencial de oxidação-redução de 35 ± 5 mV.

O valor obtido é invulgarmente elevado para agregados [4Fe-4S]^{2+,1+}, cujo potencial varia, normalmente, entre - 200 e - 450 mV. Contudo, foram descritos agregados deste tipo que apresentam potenciais de oxidação-redução da mesma ordem de grandeza, em outras proteínas, tais como, na desidrogenase da trimetilamina, no agregado H da hidrogenase de *D. vulgaris* Hildenborough e na oxidoreductase da ubiquinona:flavoproteína de transferência electrónica.^{27,28,29} A semelhança nos valores de potencial, bem como o facto destes centros apresentarem características idênticas no espectro de RPE, sugere que os agregados [4Fe-4S] nestas proteínas possuem a mesma estrutura.

Da análise da Figura IV.17 é ainda possível observar o início de uma terceira transição de oxidação-redução, à qual não se pode atribuir um valor de potencial, na medida em que o patamar final não está definido. Sabe-se, no entanto, que o potencial desta transição terá um valor inferior a -300 mV, o que está de acordo com o observado na redutase do APS de *D. salaxigens* e *D. desulfuricans* berre-eau, para as quais foi estimado um potencial inferior a -450 mV.³³ Tendo em conta que a redução total da enzima só é possível por incubação longa com ditionito de sódio e o facto do espectro de RPE da amostra nesta forma exibir um sinal de interacção entre os centros I e II, conclui-se que o potencial do centro II da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 é provavelmente menor que -300 mV.

Se a redução da redutase do APS de *D. desulfuricans*, a pH 8.0, for efectuada pela adição anaeróbica de alíquotas de uma solução de sulfito de sódio (3.0 mM), até não se conseguir baixar mais o valor de potencial e da absorvância, e se se prosseguir a redução com ditionito, obtêm-se as curvas apresentadas na Figura IV.18.

Verificou-se que o sulfito tem a capacidade de reduzir cerca de 95% da flavina e apenas 5% do centro I. Este resultado é consistente com o observado e descrito anteriormente, pelas espectroscopias de UV/visível e de RPE. De facto, verificou-se que a adição de sulfito produz um espectro de visível típico de flavinas no estado reduzido, enquanto que no espectro de RPE, se verifica o aparecimento de um sinal muito pouco intenso característico de agregados [4Fe-4S] no estado reduzido.

Tal como no caso anterior, é possível identificar duas transições, para além de uma terceira que não está bem definida. O potencial de oxidação-redução estimado para a conversão da FAD à forma FADH₂ tem um valor igual 138 ± 2 mV, enquanto que o potencial de oxidação-redução referente à redução (com ditionito de sódio) do centro I é igual a -6 ± 5 mV.

Na Tabela IV.6 apresentam-se os valores para os potenciais de oxidação-redução obtidos pela redução da redutase do APS com vários redutores.

IV.6.2. Titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de RPE

As titulações potenciométricas acopladas à espectroscopia de RPE, teve como principal objecto a detecção das possíveis espécies intermediárias envolvidas no ciclo catalítico da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

As titulações foram efectuadas a pH 8.0, usando ditionito de sódio ou metilo de vilogénio reduzido com zinco, como agentes redutores. Os potenciais de oxidação-redução foram estimados por medida da intensidade da ressonância a $g=1.939$ do sinal de RPE referente ao centro I.

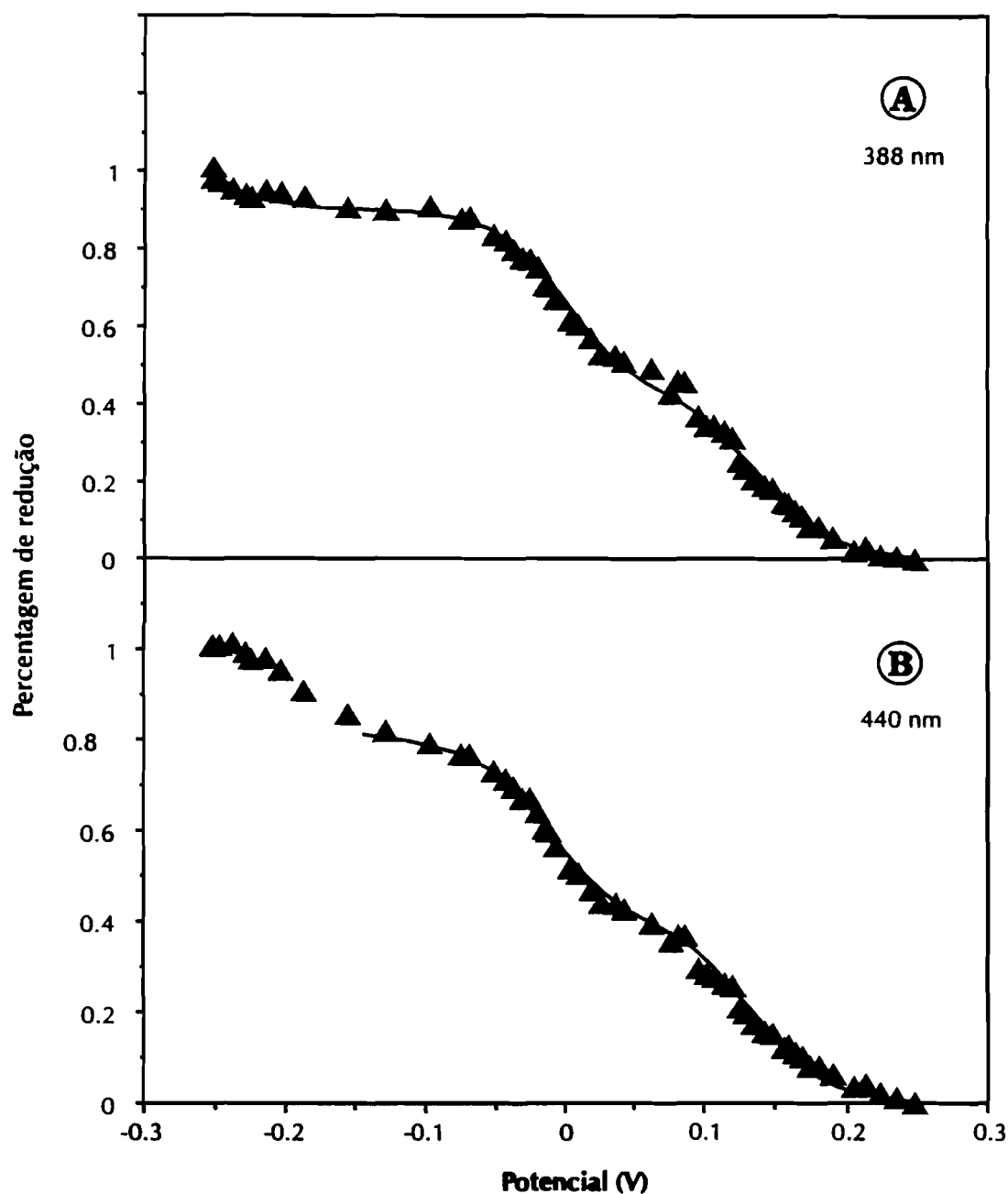


Figura IV.18. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de *D. desulfuricans*, por titulação potenciométrica com sulfito e ditionito de sódio, seguida por UV/visível. (A) variação da absorvância a 388 nm e (B) variação da absorvância a 440 nm. As curvas sobrepostas representam o ajuste dos pontos experimentais usando equações de Nernst.

Tabela IV.6

Valores de potencial de oxidação-redução, a pH 8.0, para a redutase do APS de D. desulfuricans ATCC 27774

Centro	Titulante (valores em mV)			
	Espectroscopia de visível		Espectroscopia de RPE	
	Ditionito de sódio	Sulfito/ditionito	Ditionito de sódio	Metilo de viologénio
FAD	143 ± 3	138 ± 2	—	—
Centro I	35 ± 5	-6 ± 5	-20 ± 2	-20 ± 2
Centro II	< -300	< -300	—	—

As curvas de Nersnt para as titulações são representadas graficamente na Figura IV.19. Da análise da figura verifica-se que os dados experimentais das duas experiências podem ser ajustados pela mesma curva teórica, indicando que o agente redutor não interfere com o potencial. Por outro lado, apenas é detectada a transição associada à redução do centro I, não sendo observadas a redução da flavina ou do centro II. O potencial de oxidação-redução estimado para o centro I, por esta técnica, é igual a -20 ± 2 mV, o que está de acordo com o valor determinado por UV/visível (Tabela IV.6).

Da análise da Tabela IV.6 verifica-se que a redução do centro na presença de sulfito ocorre a um valor de potencial de oxidação-redução mais negativo.

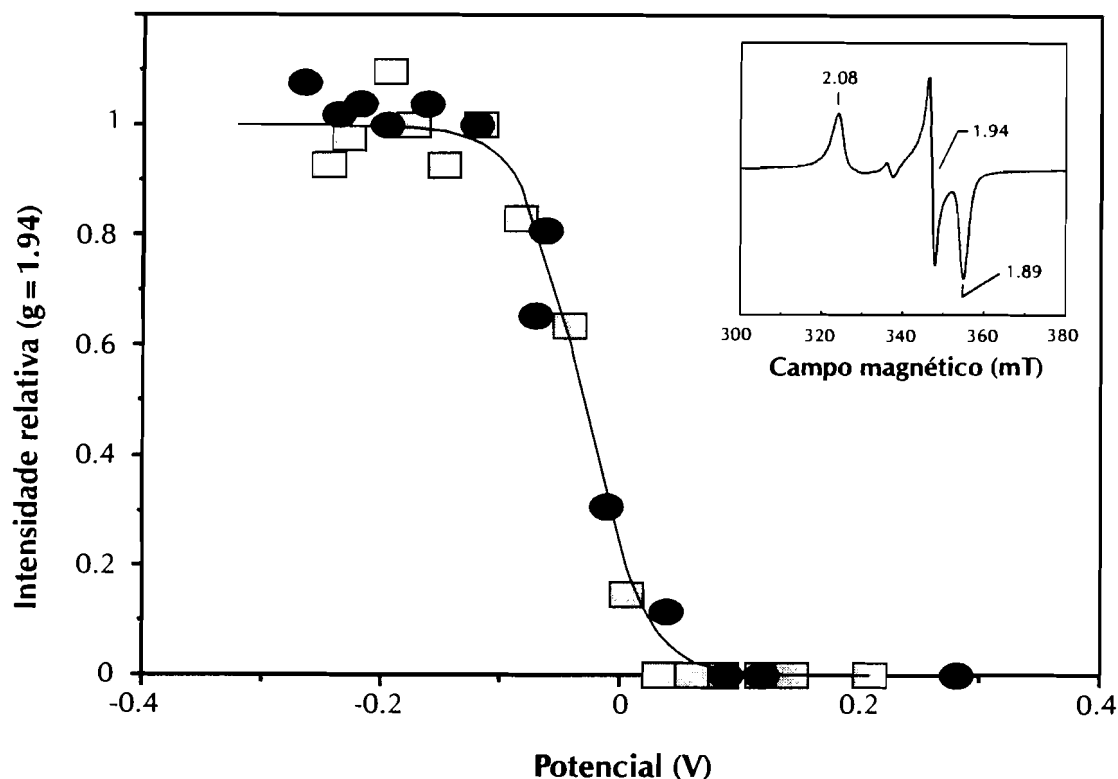
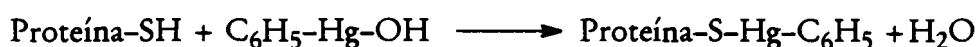


Figura IV.19. Determinação dos potenciais de oxidação-redução da redutase do APS de *D. desulfuricans*, por titulação potenciométrica acoplada à espectroscopia de RPE. Como titulantes foram usados ditonito de sódio, 0.2 M em Tris-HCl, pH ~9.0 (■) e metilo de viologénio reduzido com zinco (●). As curvas sobrepostas representam o ajuste dos pontos experimentais usando equações de Nernst.

IV.7. O efeito do pHMB na redutase do APS de *D. desulfuricans*

A utilização de certos inibidores tem permitido, em diversos casos, determinar a natureza do ácidos aminados e co-factores que fazem parte do sítio activo e que participam na formação do complexo enzima-substrato. Entre as substâncias capazes de se fixarem a vários grupos das proteínas, tais como o grupo hidroxilo, sulfidrílo ou carboxilo, e de provocarem a perda das propriedades catalíticas, quer por modificação da conformação, quer por bloqueamento do sítio activo da enzima, encontram-se os iões de metais pesados, ou compostos como o mono-iodo-acetato ou o *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB).

O *p*HMB é um reagente mercurial que reage especificamente com os grupos tiol (-SH) das proteínas, formando complexos mercaptídicos mercuriais com constantes de dissociação muito baixas. *In vivo*, têm um efeito tóxico, que está normalmente associado a alterações metabólicas provocadas pela inactivação de várias enzimas. *In vitro*, o *p*HMB é geralmente usado na detecção e quantificação de grupos -SH em proteínas, de acordo com a seguinte equação:³⁰



A formação do complexo proteína-*p*HMB é seguida pelo aumento da absorvância a 250 nm. A pH ~ 7.0, o *p*HMB reage na razão de 2:1 com o enxofre inorgânico e de 1:1 com os grupos sulfidrílo dos resíduos cisteicos.

Assim, a inactivação pelo *p*HMB de proteínas que contêm grupos tiol poderá fazer-se ao nível do centro activo (por exemplo em agregados ferro-enxofre) ou pela modificação de resíduos de ácidos aminados tiolados, provocando a alteração da conformação ou estabilidade da enzima.

O efeito do *p*HMB na redutase do APS foi estudado pela primeira vez por Peck e colaboradores em 1965, nas enzimas isoladas de *D. vulgaris* Hildenborough e *T. thioparus*.¹⁷ Os autores verificaram que a actividade da enzima é inibida por este reagente e que o efeito exercido era dependente do tipo de aceitador electrónico. Assim, observaram que o efeito do *p*HMB é mais acentuado no ensaio enzimático com ferricianeto do que quando se usa citocromo *c*, sugerindo a existência de mais do que uma via para o fluxo electrónico entre a redutase do APS e os aceptadores electrónicos. A redução do ferricianeto seria um processo rápido dependente dos agregados ferro-enxofre, enquanto que na presença de citocromo *c* a oxidação do sulfito seria lenta e dependente de oxigénio. Pela aplicação de técnicas de espectroscópicas de UV/visível e RPE, os autores demonstraram também, que o efeito inibitório do *p*HMB é protegido pela adição prévia de sulfito e AMP. Com bases nestes resultados Peck e colaboradores propuseram que, pelo menos, um dos agregados

ferro-enzofre estaria envolvido no mecanismo de catálise da redutase, não explicando no entanto, qual o papel destes centros na redução do APS (ver capítulo III).

Deste modo, e com o objectivo de estudar a interacção do *pHMB* com a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774, bem como o efeito deste composto nos centros activos e, portanto no mecanismo catalítico da enzima, foram preparadas várias amostras às quais se adicionou *pHMB* em diferentes condições e posteriormente estudadas pela aplicação de várias técnicas espectroscópicas. Foi também determinada a sua capacidade inibitória nos ensaios enzimáticos usando dois tipos de aceitadores electrónicos, ferricianeto e citocromo *c* de coração de cavalo.

IV.7.1. Titulação das cisteínas com *pHMB*

A quantificação das cisteínas presentes na redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 foi efectuada seguindo a formação do produto da reacção da proteína com *pHMB*, por UV/visível. A titulação das cisteínas faz-se adicionando sucessivamente pequenas alíquotas de *pHMB* (entre 0 e 20 μ l de uma solução 0.2 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 7.0) a uma solução da proteína a titular (3.9 μ M). Após cada adição, mede-se o aumento da absorvância a 250 nm. O gráfico que representa esse aumento em função da razão *pHMB*/proteína está representado na Figura IV.20. Observa-se que os pontos experimentais se distribuem sobre duas rectas, cujo ponto de intersecção, correspondente ao máximo de absorção, permite determinar o número total de grupos sulfidrílo que reagiram com o composto mercurial.

O valor obtido para o ponto de interacção é aproximadamente igual a 21 moles de *pHMB* por mole de proteína, o que está de acordo com o número de resíduos de cisteína determinado por hidrólise ácida (20 cisteínas), podendo admitir-se que, na proteína, não existem pontes dissulfureto.



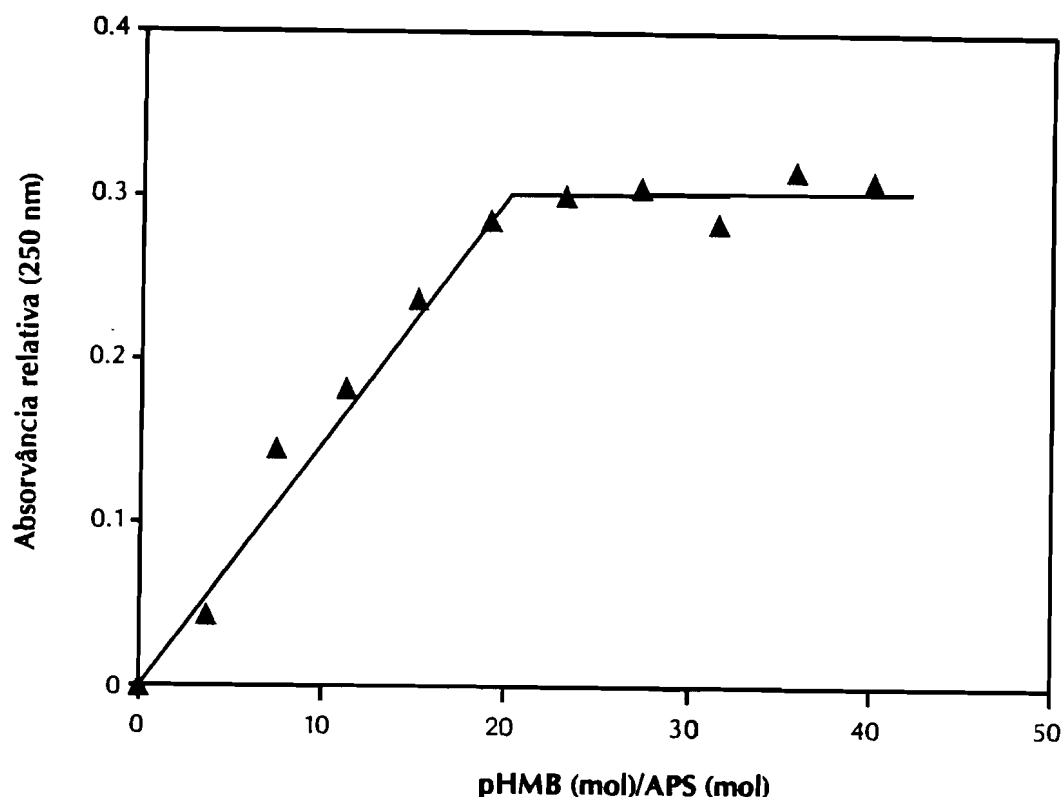


Figura IV.20. Quantificação dos resíduos cisteicos presentes na redutase do APS de *D. desulfuricans* com pHMB, segundo o método de Boyer.

Tendo em conta a estequiometria da reacção, 16 moles de pHMB reagiriam com os oito átomos de enxofre inorgânico dos dois agregados $[4\text{Fe-4S}]$; seriam ainda necessárias 8 moles de composto mercurial para interagir com os grupos tiol dos resíduos de cisteínas que coordenam os átomos de ferro dos agregados. Assim, o número total de moles de pHMB por proteína deveria ser igual a 24. Dado que se obteve um valor inferior a este, poder-se-á pensar que, pelo menos num agregado, os átomos de ferro não estão todos coordenados por cisteínas. Esta suposição vem de encontro com o proposto por Lampreia e colaboradores para a redutase do APS de *D. gigas*.¹⁵ Com base nos parâmetros obtidos da análise do espectro de Mössbauer correspondente ao centro I, os autores põem a hipótese de uma coordenação de um átomo azoto ou oxigénio a um dos átomos de ferro do centro I.

IV.7.2. O efeito do pHMB na actividade da redutase do APS

O efeito da adição de quantidades crescentes de pHMB no ensaio da actividade da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774, usando ferricianeto de potássio como aceitador de electrões, está representado no gráfico da Figura IV.21. Verifica-se que, para concentrações de pHMB superiores a 0.5 mM, a actividade da redutase é inibida cerca de 85%.

Quando se usa citocromo *c* como aceitador electrónico, a redutase do APS é inibida aproximadamente 50% para concentrações de pHMB superiores a 0.2 mM, como se pode observar na Figura IV.22. No entanto é de referir que quando se compara a capacidade de inibição do reagente mercurial para concentrações inferiores a 0.3 mM, observa-se que no ensaio do citocromo *c* o decréscimo da actividade é mais significativo do que no ensaio do ferricianeto.

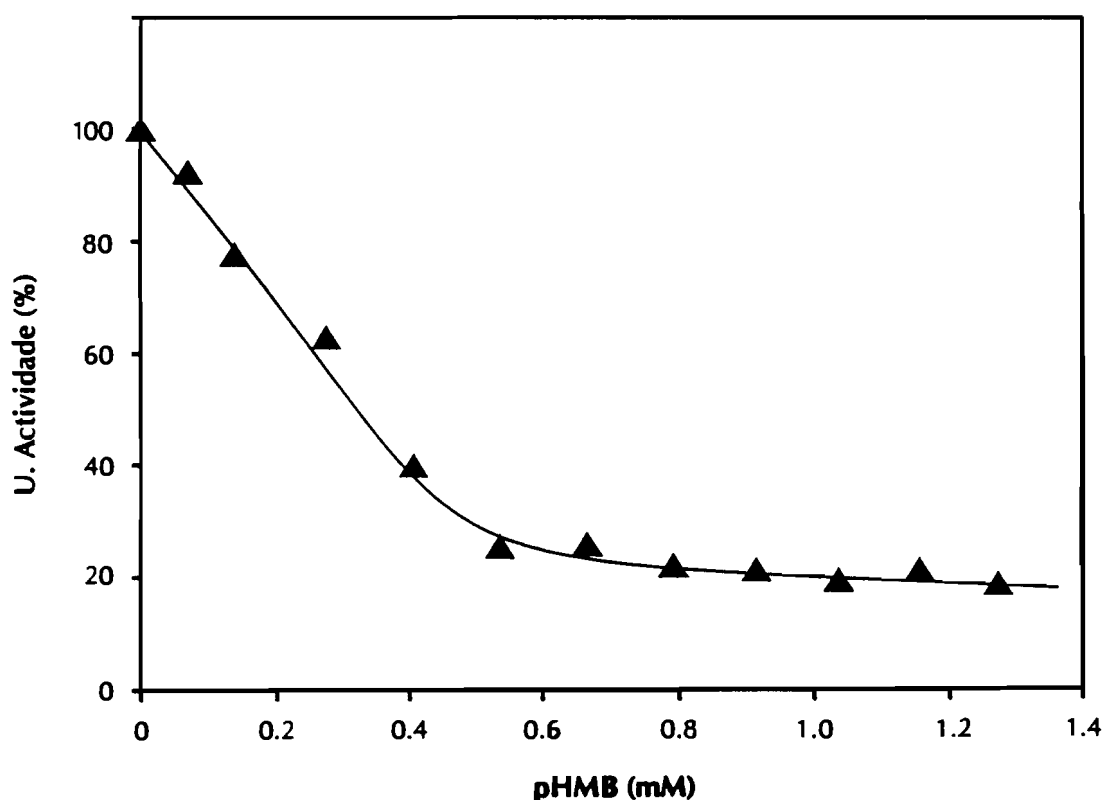


Figura IV.21. Efeito do pHMB na actividade da redutase do APS na presença de ferricianeto de potássio como aceitador de electrões.

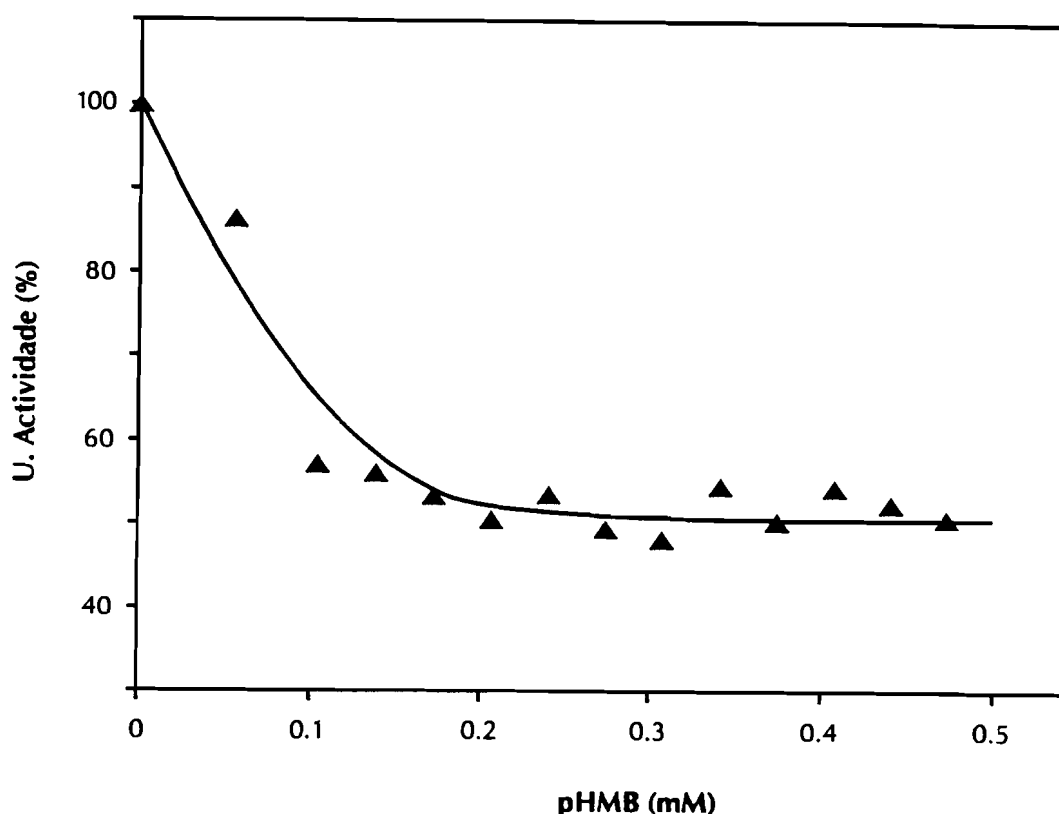


Figura IV.22. Efeito do pHMB na actividade da redutase do APS na presença de citocromo *c* de cavalo como aceitador de electrões.

Tendo em conta o mecanismo reaccional proposto por Bramlett e colaboradores para a redutase do APS de *D. vulgaris*, o pHMB não deveria exercer qualquer efeito na reacção de oxidação do sulfito no ensaio com citocromo *c*, na medida em que neste caso o fluxo electrónico não "passaria" pelos agregados ferro-enzofre, sendo dependente de iões superóxido gerados pela mono-redução do oxigénio através da flavina (ver capítulo III).³¹

O facto da actividade da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 ser inibida pelo pHMB, quer na presença de ferricianeto quer na de citocromo *c*, indica que o composto mercurial não interacciona apenas com os agregados, tendo provavelmente efeitos colaterais na conformação da proteína. Poderá, ainda, indicar que a actividade da enzima, na

presença de citocromo *c* como aceitador de electrões é dependente dos agregados ferro-enxofre, contrariando a hipótese de Bramlett e colaboradores.

IV.7.3. Efeito do pHMB no espectro de UV/visível da redutase do APS

Com o objectivo de tentar estabelecer o papel dos substratos na interacção do pHMB com a redutase, foram efectuados estudos de adição sequencial de sulfito e AMP antes e depois da incubação da redutase com o agente mercurial.

A Figura IV.23 mostra o efeito do pHMB no espectro de visível da redutase do APS. Os espectros foram obtidos pela adição progressiva de pHMB (volumes entre 0 e 30 μ l de uma solução 1.4×10^{-2} M) a uma amostra de enzima (3.64 μ M) em tampão Tris-HCl pH 7.6. A absorvância foi registada até não se detectar qualquer variação.

Verifica-se que com o aumento da concentração do composto mercurial, ocorre uma diminuição geral da absorvância, sendo no entanto, mais significativa a 389 nm. A representação gráfica da variação da absorvância em função da concentração de pHMB mostra que para concentrações inferiores a 0.09 mM existe uma relação linear entre a absorvância e a concentração de pHMB. Para concentrações superiores, atinge-se o máximo da variação, correspondendo a aproximadamente 25% da absorção inicial.

Se uma amostra de redutase do APS (5.5 μ M) em tampão Tris-HCl pH 7.6, for incubada com pHMB (0.2 mM) à temperatura ambiente, obtém-se a curva representada na Figura IV.24. Pensa-se que o decréscimo da absorção do espectro de visível esteja associado à interacção do pHMB com os agregados ferro-enxofre. Contudo este decréscimo poderá, também, ser explicado em termos de alteração da estrutura da proteína e consequente desnaturação.

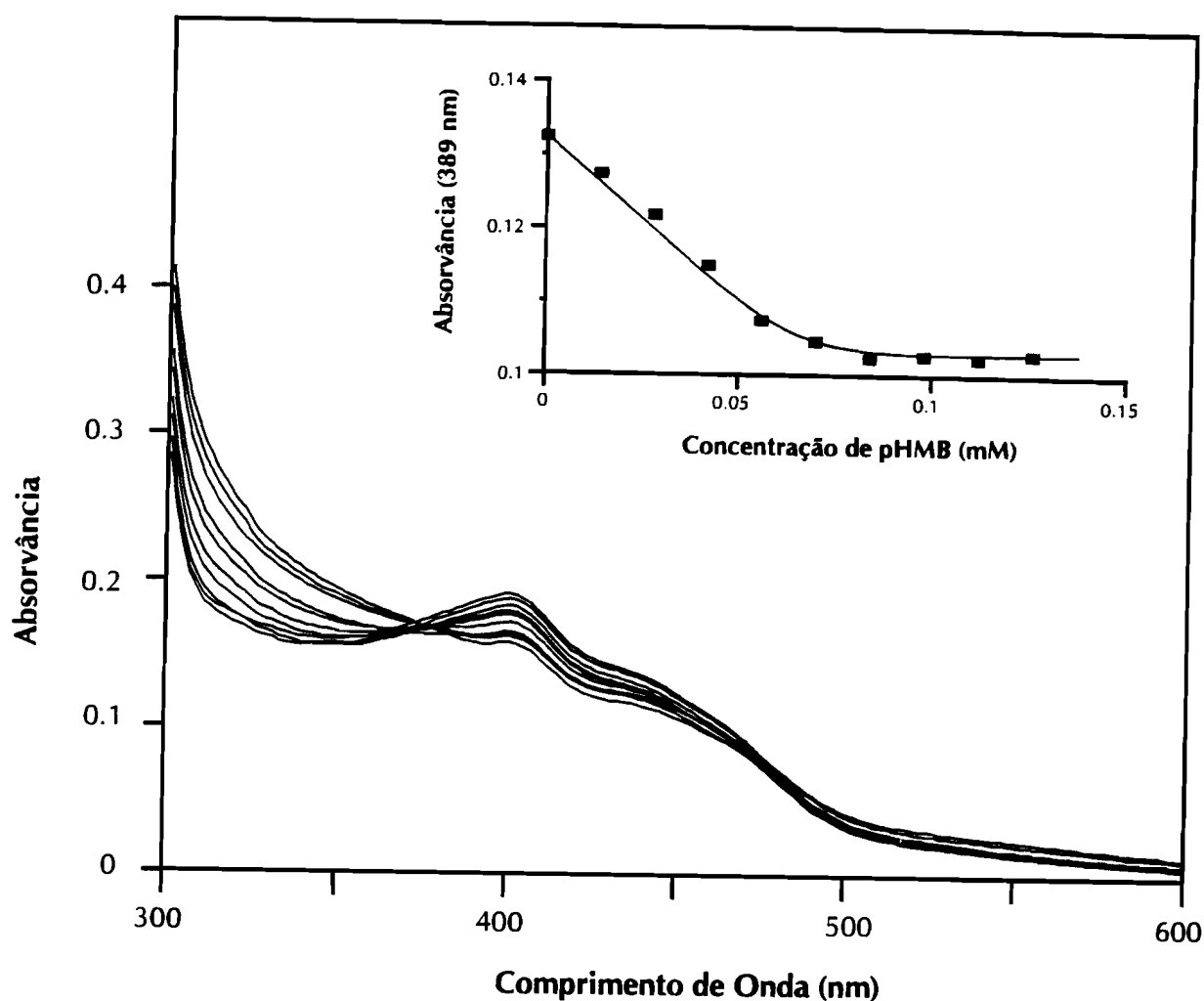


Figura IV.23. Efeito do pHMB no espectro de visível da redutase do APS de *D. desulfuricans*.

No entanto, como será demonstrado na secção seguinte, a interacção do pHMB com os agregados não implica a destruição destes centros, pelo menos quando a concentração deste reagente no ensaio é igual ao dobro da concentração da proteína.

O efeito dos substratos na interacção do pHMB com a redutase do APS vem representado na Figura IV.25. A ordem relativa da adição de pHMB e de sulfito e AMP é arbitrária, provocando sempre aquele, um decréscimo adicional da intensidade do espectro de visível da redutase.

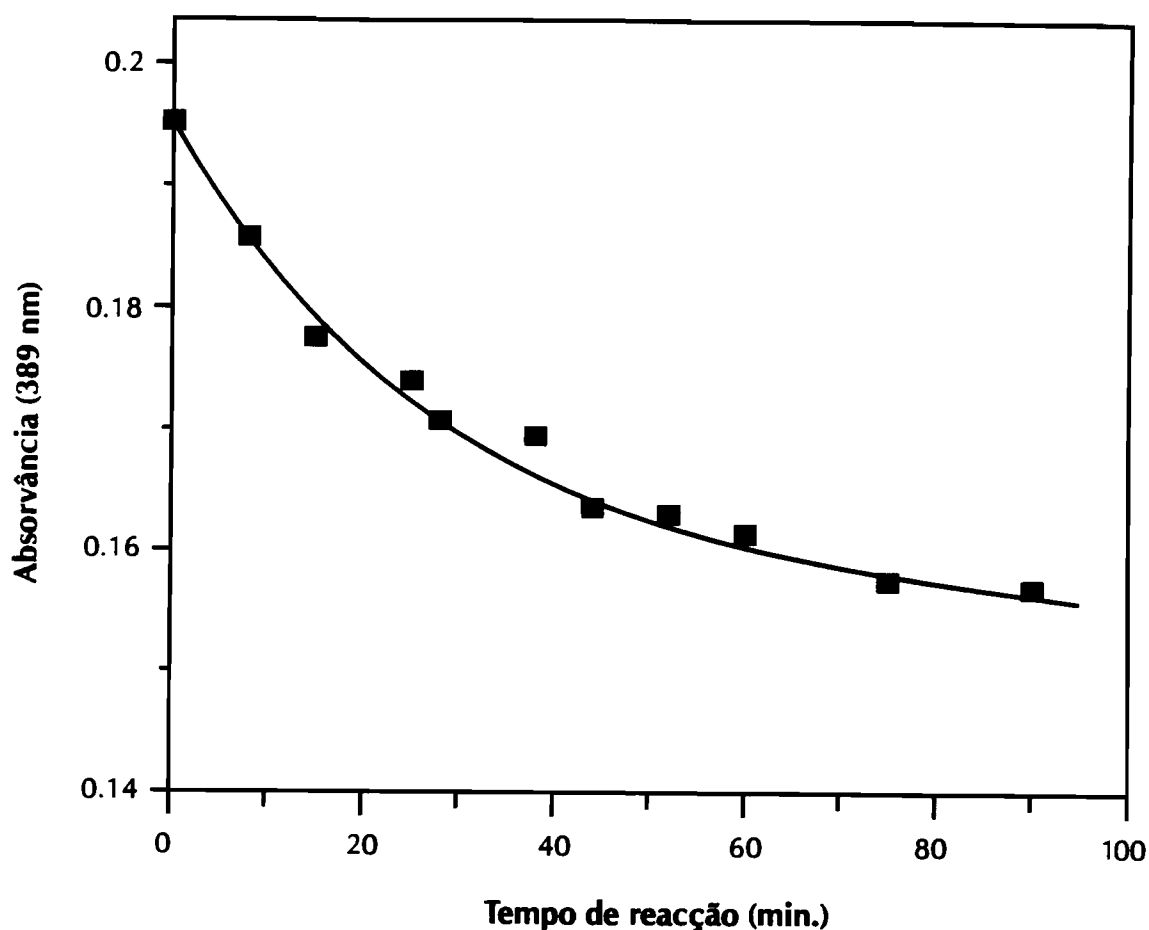


Figura IV.24. Efeito do pHMB (0.2 mM) ao longo do tempo, na redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

O efeito deste reagente parece não depender da presença de substratos, que por isso não devem exercer qualquer efeito protector, como tinha sido sugerido por Bramlett.¹⁴

É interessante referir que apesar da presença de pHMB é observado um aumento da absorvância a 320 nm, correspondente à formação do aducto entre a flavina e o sulfito. Este facto demonstra que o composto mercurial não modifica a estrutura à volta da flavina. Deste modo, confirma-se que a diminuição da absorvância produzida pela incubação com pHMB está associada a alterações da estrutura dos agregados ferro-enxofre.

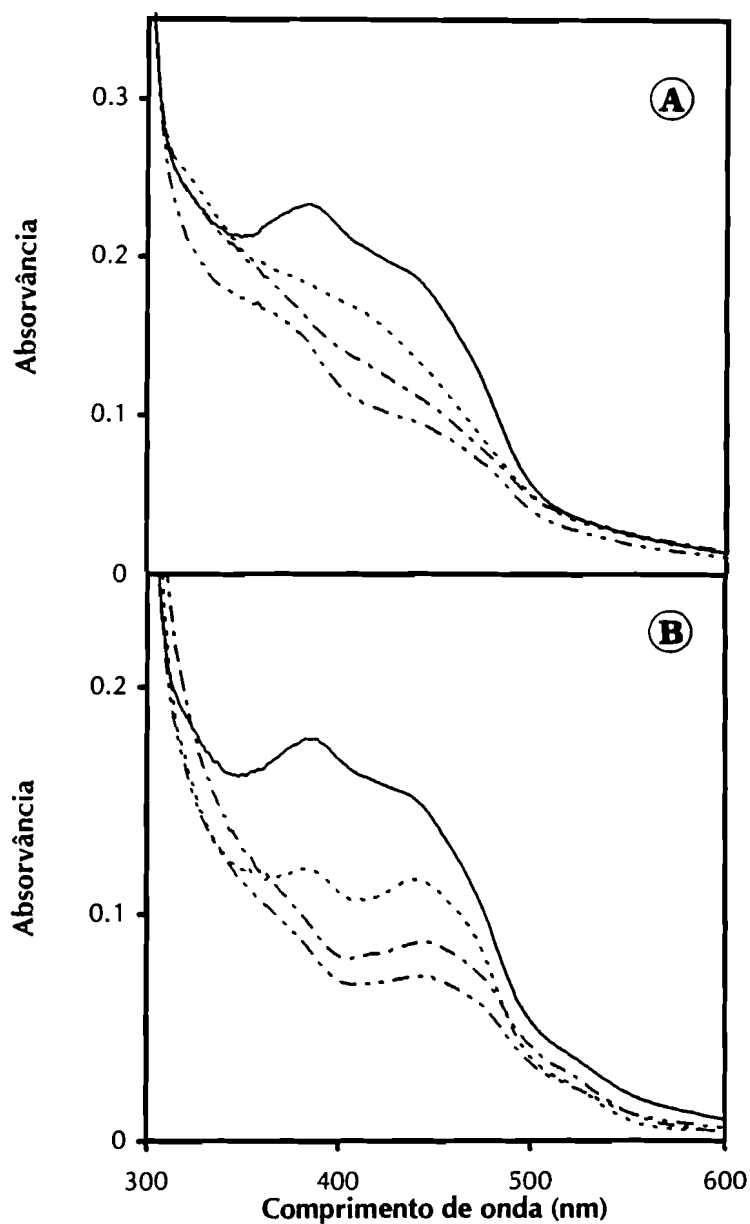


Figura IV.25. Efeito dos substratos no espectro de visível da redutase do APS incubada com pHMB. (A) enzima nativa, (—); enzima mais sulfito, (- - -); enzima mais sulfito e AMP, (- · - · -); enzima reagida com sulfito, AMP e pHMB (2x excesso), (- · - · -). (B) enzima nativa, (—); enzima mais pHMB (2x excesso), (- - -); enzima mais pHMB mais sulfito, (- · - · -); enzima mais pHMB mais sulfito e AMP, (- · - · -).

IV.7.4. Efeito do pHMB no espectro de RPE da redutase do APS

O efeito do pHMB no espectro de RPE da redutase do APS nos diferentes estados de oxidação vem representado na Figura IV.26. As amostras foram preparadas pela incubação da enzima ($\sim 180 \mu\text{M}$) com pHMB (2 vezes em excesso), durante cerca de 10 minutos, seguindo-se a adição normal dos substratos ou de ditionito de sódio.

A presença de pHMB origina uma ligeira diminuição dos sinais de RPE associados ao centro I (obtidos pela adição de sulfito e AMP ou por redução química rápida com ditionito de sódio). Surpreendentemente, não se conseguiu obter o sinal de interacção (observando-se apenas o sinal característico do centro I) normalmente obtido por redução química longa (~ 30 minutos), nem mesmo numa amostra em que se prolongou a incubação com ditionito de sódio, em atmosfera anaeróbica, durante uma hora.

A reoxidação total das amostras reduzidas quimicamente resulta num aumento drástico do sinal "isotrópico" normalmente visível nas amostras nativas. Este sinal é, provavelmente, originado pela interconversão dos agregados $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ na forma $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$, bem caracterizado na aconitase e na ferredoxina I de *D. gigas* (Figura IV.26E).^{24,32} A quantificação em spins das espécies detectadas é apresentada na Tabela IV.7.

Põe-se agora a questão se ambos os centros (centro I e centro II), ou se apenas um sofre interconversão. Com base nos resultados de RPE é difícil indentificar inequivocamente qual o centro que se interconverte na presença de pHMB, na medida em que apenas são detectadas espécies paramagnéticas. No entanto, e da análise preliminar dos espectros de Mössbauer de amostras equivalentes, pensa-se que o pHMB seja responsável, por um lado, pela modificação do potencial de oxidação-redução do centro II, dificultando a sua redução nas condições experimentais (resultados não publicados). Por outro lado, a interacção do pHMB promoverá a interconversão de pelo menos parte do centro I à forma $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$.

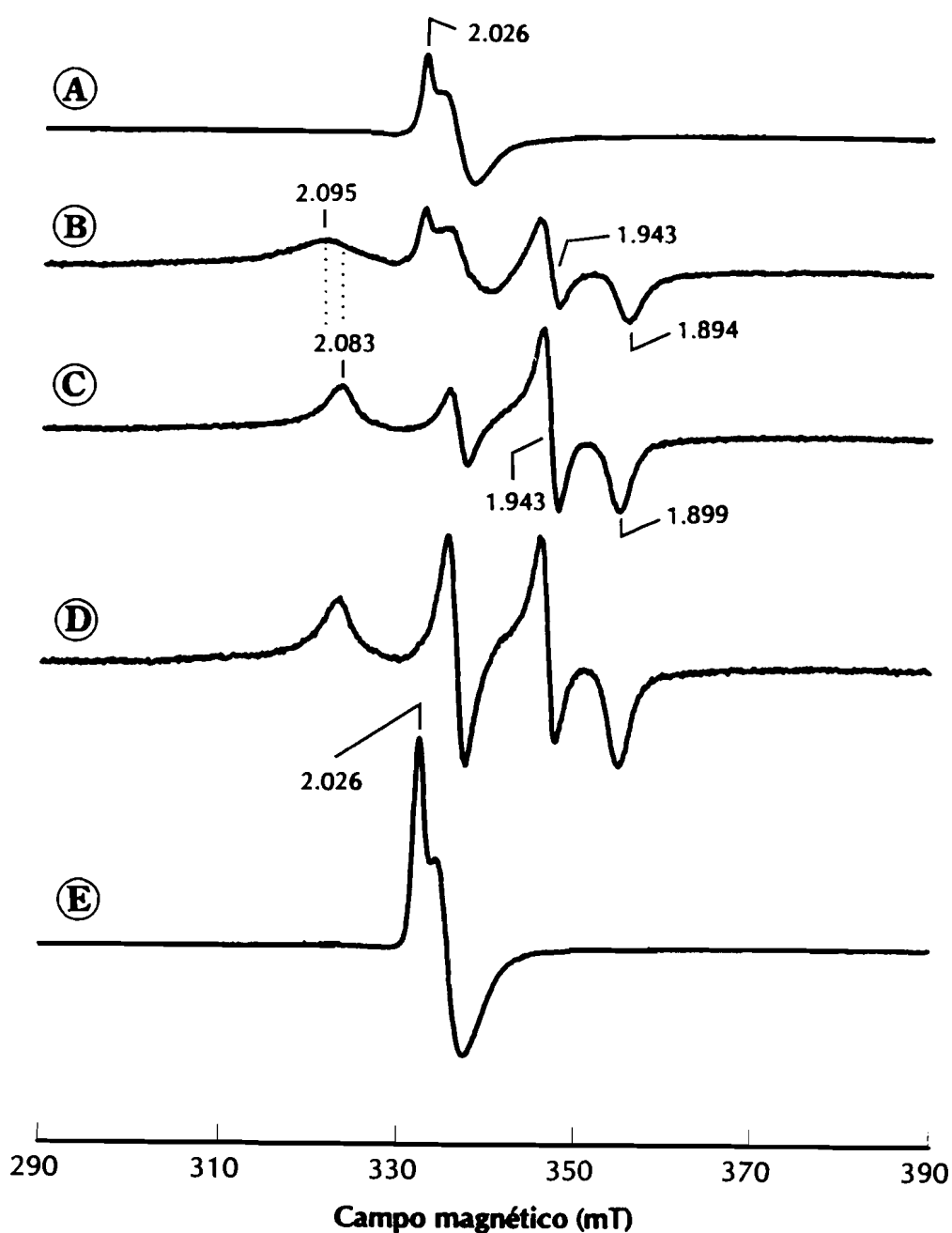


Figura IV.26. Efeito do pHMB (2x excesso) no espectro de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans*. (A) enzima nativa; (B) enzima incubada com pHMB mais sulfito e AMP; (C) redução parcial com ditionito de sódio ($t < 1$ min.) da amostra incubada com pHMB; (D) redução longa ($t > 15$ min.) com ditionito da enzima reagida com pHMB e (E) reoxidação da amostra C (2 horas e 30 minutos). Condições experimentais: temperatura, 8 K; frequência da micro-onda, 9.44 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 6.3×10^4 . Nota: a espécie radicalar a $g=2.002$, nos espectros C e D, deve-se a um ligeiro excesso de ditionito nas amostras.

Tabela IV.7

*Quantificação dos sinais de RPE, observados pela adição de pHMB
à redutase do APS em diferentes estados de oxidação*

Espécie de RPE	Concentração de spins (spins/molécula)		
	Estado da amostra	Sem pHMB	Com pHMB
"g=2.025"	Nativa	0.2	0.19
Centro I	AMP + SO ₃ ²⁻	0.4	0.23
	Redução com ditionito (t < 1 min.)	1.0	0.68
Centro I + Centro II	Redução com ditionito (t < 15 min.)	1.5	0.78
[3Fe-4S] ¹⁺	Redução com ditionito (t < 1 min.) mais pHMB seguida de reoxidação	—	0.55

A dependência da intensidade do sinal reoxidado com a temperatura e a potência da micro-onda, mostra que as propriedades de relaxação desta espécie são características de um agregado [3Fe-4S] na forma oxidada.

Se à mostra reoxidada, se adicionar sulfito e AMP, obtêm-se as espécies observadas normalmente, sem a incubação com pHMB (Figura IV.27), isto é, a adição de sulfito e AMP origina a redução parcial do centro I, que é caracterizado por um sinal de RPE com propriedades electrónicas específicas. A incubação desta amostra (reagida com sulfito e AMP) com ditionito de sódio (0.1 M em Tris-HCl, pH ~ 9.0), durante cerca de trinta minutos origina a redução parcial da enzima, nunca tendo sido possível obter a enzima no estado totalmente reduzido (Figura IV.27D).

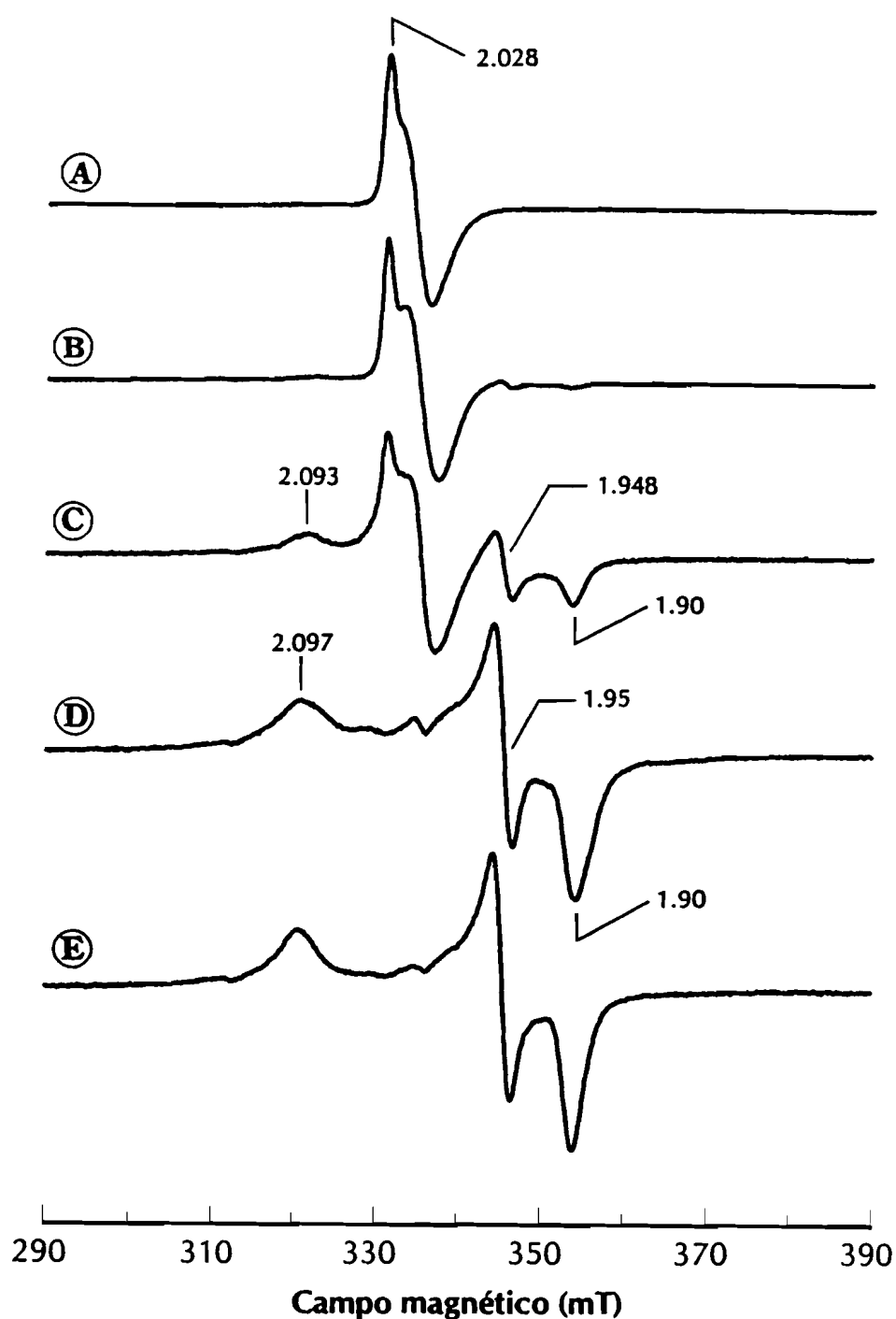


Figura IV.27. Adição de sulfito, AMP e ditionito à amostra reoxidada após incubação com pHMB (2x excesso). (A) enzima reagida com pHMB e reoxidada 2 horas e 30 min.; (B) amostra A mais sulfito; (C) amostra B mais sulfito e AMP; (D) amostra C reduzida com ditionito de sódio; (E) amostra D com mais ditionito. Condições experimentais: temperatura, 8 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1×10^4 .

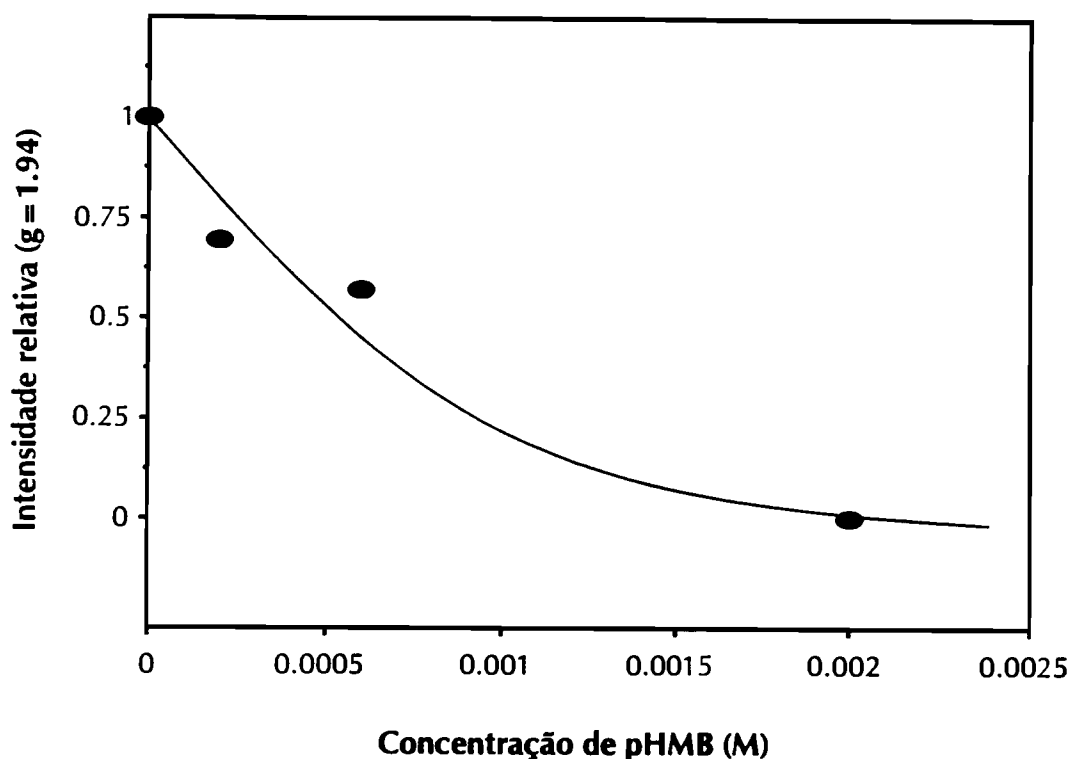


Figura IV.28. Efeito da adição de quantidades crescentes de *p*HMB no espectro de RPE da redutase do APS parcialmente reduzida com ditionito de sódio.

Tal como no espectro de UV/visível a incubação da redutase do APS com quantidades crescentes de *p*HMB resulta na diminuição total da intensidade do sinal correspondente ao centro I (Figura IV.28).

Com os dados existentes não se sabe se o desaparecimento do sinal do centro I, para concentrações elevadas (20 vezes em excesso) se deve à sua interconversão à forma trinuclear ou se à sua destruição total.

De referir ainda que a ordem de adição do *p*HMB em relação aos substratos ou ao ditionito não é importante, tendo sido obtidos os mesmos resultados pela adição do reagente mercurial antes ou depois dos restantes compostos. Este facto é consistente com o observado no espectro de UV/visível, quando da adição sequencial de *p*HMB e dos substratos.

IV.8. Discussão

Com base no anteriormente exposto, verifica-se que de um modo geral, a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 apresenta propriedades físico-químicas semelhantes às redutases isoladas de outras bactérias redutoras de sulfato.³³ A composição do sítio activo parece ser análoga à da redutase do APS de *D. gigas*.³ A redutase do APS de *D. desulfuricans* contém um grupo FAD e oito átomos de ferro, que se encontram distribuídos por dois agregados do tipo $[4\text{Fe-4S}]^{2+,1+}$. Tal como nas restantes enzimas deste tipo, o seu mecanismo catalítico parece envolver: i) a formação de um aducto entre a flavina e a molécula de sulfito e ii) a interacção do AMP com o centro I. A interacção deste nucleotídeo com o centro I origina, provavelmente, uma alteração da conformação do agregado, que posteriormente se reflecte nas suas propriedades magnéticas. De facto, a comparação do sinal de RPE correspondente ao centro I, obtido por redução química com ditionito ou por reacção com sulfito e AMP, revela algumas diferenças, principalmente nos valores da largura de linha e valor de g_{max} .

A redutase do APS contém oito átomos de ferro, que com base nos dados das espectroscopias de RPE e Mössbauer, se sabe estarem organizados em dois agregados do tipo $[4\text{Fe-4S}]$ distintos (centro I e II). As propriedades electrónicas e magnéticas dos dois centros diferem significativamente, o que se reflecte nas suas velocidades de relaxação e nos valores de potencial de oxidação-redução. Enquanto que o centro I é detectável até aproximadamente 35 K, o centro II deixa de ser visível entre 20 e 25 K.

O elevado potencial de oxidação-redução associado ao centro I não é vulgar para este tipo de agregado, apesar de terem sido identificados agregados que apresentam o mesmo valor de potencial na desidrogenase da trimetilamina, na hidrogenase de *D. vulgaris* Hildenborough e na oxidoreductase da ubiquinona:flavoproteína de transfrência electrónica.^{28,29,34} A comparação da estrutura primária da desidrogenase da trimetilamina com a da ubiquinona:flavoproteína de transferência electrónica revela que o agregado $[4\text{Fe-4S}]$ se encontra coordenado a quatro resíduos de cisteína, distribuídas de um modo semelhante nas sequências de ambas as proteínas.³⁴ A sequência de ácidos aminados da

ubiquinona:flavoproteína de transferência electrónica indica, ainda, que o agregado [4Fe-4S] está rodeado por resíduos que tornam o ambiente relativamente polar, o que poderá facilitar a estabilização da forma reduzida do agregado, tornando o seu potencial de oxidação-redução mais positivo.

A enzima possui uma massa molecular aproximada de 165 kDa, distribuída por duas subunidades com 70 (α) e 20 kDa (β), respectivamente. A atribuição da estrutura das subunidades tem sido uma questão controversa, por depender da massa molecular total da proteína. Por exemplo, para a redutase purificada de *D. vulgaris* Hildenborough foram propostos dois arranjos diferentes. Enquanto que Bramlett e Peck estabeleceram uma estrutura do tipo $\alpha_3\beta$ (72 e 20 kDa),³⁵ com base numa massa molecular global de 220 kDa, Verhagen e colaboradores propõem que uma molécula da proteína (186 kDa) é constituída por duas subunidades de 67.8 kDa e duas de 25.6 kDa.³⁶

Neste trabalho, foi conseguida pela primeira vez a determinação de uma sequência N-terminal da subunidade maior (70 kDa). A comparação da sequência N-terminal obtida com a da desidrogenase da trimetilamina, não revela qualquer homologia significativa, o que em termos da estrutura do sítio activo poderá não ter significado, uma vez que se estão a comparar regiões N-terminais de proteínas com massa molecular elevada.

A interconversão do(s) agregado(s) [4Fe-4S] à forma [3Fe-4S], na presença de *p*HMB, poderá ter um significado importante no ciclo catalítico da enzima. Tal como em outros casos, como por exemplo na aconitase, a actividade da enzima poderá ser modelada pela interconversão. Assim, a forma [3Fe-4S] corresponderia à forma inactiva, à qual não se ligaria o substrato natural. O facto de, na forma nativa, nunca ter sido detectado um sinal "isotrópico" com aproximadamente 1 spin, seria explicado pelo elevado potencial de oxidação-redução associado ao centro I, que provavelmente estabilizaria a forma [4Fe-4S].

De um modo geral, a combinação dos dados obtidos da espectroscopia de UV/visível com os dados cinéticos, na presença de *p*HMB (ensaio com ferricianeto), sugere que a diminuição da actividade seja devida à interacção do composto mercurial com os agregados ferro-enxofre presentes na redutase do APS.

Na Figura IV.29 apresenta-se uma proposta preliminar para um modelo do arranjo estrutural das subunidades da redutase do APS de *D. desulfuricans*, a partir dos dados bioquímicos e espectroscópicos disponíveis. Tendo em conta este modelo, o centro I encontrar-se-ia ligado às duas subunidades maiores, que estariam dispostas simetricamente, enquanto que o segundo agregado de [4Fe-S] (centro II) estaria localizado na subunidade β . A posição do centro I na interface das subunidades α , facilitaria, assim, o acesso dos substratos. Por outro lado, a fácil acessibilidade do solvente ao centro I permitiria a estabilização deste agregado na forma reduzida, através da formação de pontes de hidrogénio entre a cadeia polipeptídica e o agregado ferro-enxofre, favorecendo a reacção catalítica e contribuindo para o elevado potencial de oxidação-redução observado. De acordo com os dados das espectroscopias de visível e RPE, o fluxo electrónico fôr-se-ia da molécula FADH₂ para o centro I e deste para o centro II, na medida em que se sabe que a formação do aducto FAD:sulfito promove a redução do centro I, na presença de AMP. Aqui, o centro II teria apenas um papel redox, tal como nos agregados [4Fe-4S] das ferredoxinas bacterianas, justificando o facto do seu potencial de oxidação-redução ter um valor semelhante ao dos agregados nestas proteínas. A flexibilidade da conformação entre as subunidades α e, portanto, o fácil acesso dos substratos poderia também explicar a reversibilidade da reacção catalisada por esta enzima.

O modelo permite, ainda explicar a rápida inactivação da redutase do APS após a sua purificação, bem como a perda da flavina ao longo do período de armazenamento, pois a sua localização entre as subunidades poderá contribuir para uma maior "labilidade" deste cromóforo.

Outra hipótese para a localização dos centros ferro-enxofre, numa estrutura do tipo $\alpha_2\beta$ seria a seguinte: os dois agregados [4Fe-4S] poderiam estar ambos na subunidade menor (β), o que facilitaria a possível transferência electrónica entre os dois centros e explicaria a interacção magnética entre os mesmos, detectada em RPE e Mössbauer.

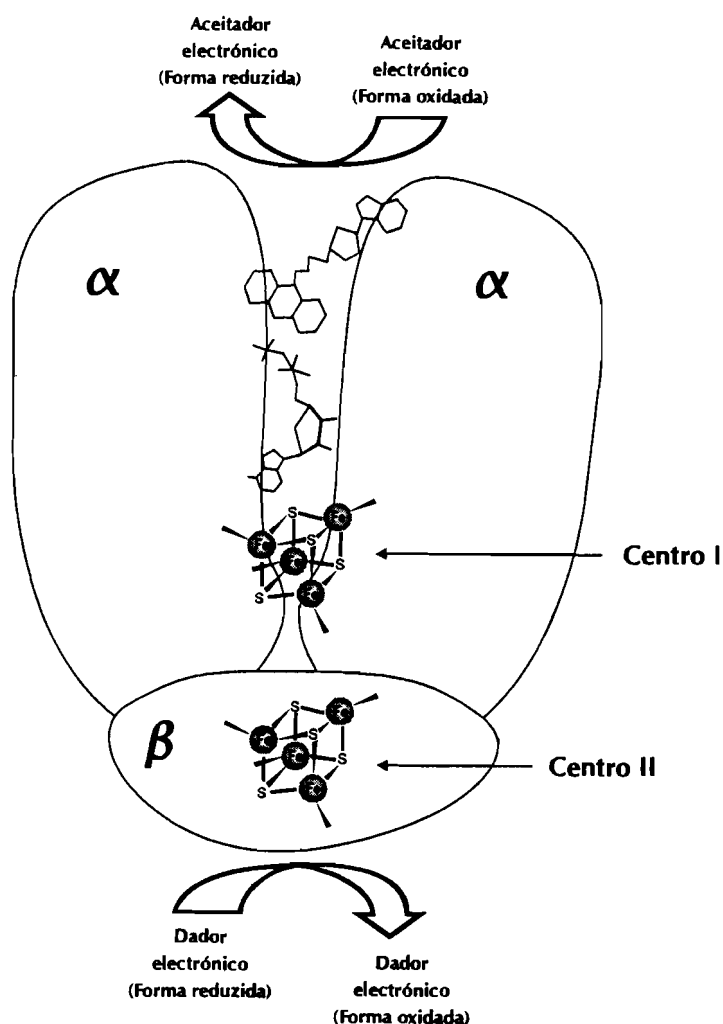


Figura IV.29. Modelo esquemático para a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

A possibilidade de um arranjo do tipo $\alpha_2\beta_2$ deverá ser, também, considerado, uma vez que aos métodos usados para a determinação da proteína e da sua massa molecular, está associado uma incerteza relativamente grande. Uma configuração deste tipo poderá permitir uma maior estabilidade da proteína e estaria de acordo com o descrito anteriormente por vários autores (ver capítulo III).^{15,36}

O dador de electrões fisiológico da redutase do APS não é conhecido. No entanto, Chen e colaboradores verificaram, *in vitro*, que o NADH reduz esta enzima na presença de uma oxidase do NADH, uma flavoproteína (1 x FMN, 65 kDa) purificada de *D. vulgaris*.³⁷

Contudo, os autores não demonstram se na presença de NADH a enzima se encontra cataliticamente activa.

O trabalho futuro incidirá na determinação da sequência total de ácidos aminados da redutase do APS de bactérias redutoras de sulfato, e identificação dos padrões de ligação aos agregados ferro-enxofre. A determinação das sequências N-terminal das subunidades da redutase isolada de diferentes organismos está em curso, com a finalidade da construção de uma árvore filogenética (tal como foi efectuado para o citocromo c_3).

O efeito do *p*HMB na redutase do APS será aprofundado. Uma possibilidade interessante será a tentativa de marcar isotopicamente o centro I (com ^{57}Fe), para posterior análise pela espectroscopia de Mössbauer. A marcação isotópica das formas $[\text{3Fe-4S}]$ e $[\text{4Fe-4S}]$ terá como objectivo a identificação do sítio de ligação do substrato.

IV.9. Bibliografia

1. Ishimoto, M., e Fugimoto, D. 1961. *J. Biochem. (Tokyo)* 50, 299-304.
2. Liu, M.-C., e Peck, H.D., Jr. 1981. *J. Biol. Chem.* 256, 13159-13164.
3. Pereira, J.M.P.L. 1989. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL.
4. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* 227, 680-685.
5. Moore, S., e Stein, W.H. 1963. *Methods in Enzymology* 6, 819-831.
6. Yuen, S., Hunkapiller, M.W., Wilson, K.J., e Yuan, P.M. 1986. *User Bulletin Appl. Biosystem* n° 25.
7. Yuen, S., Sheer, D., Hsi, K.-L., e Mattaliano, R. 1990. *User Bulletin Appl. Biosystem* n° 42.
8. Fisher, D.S., e Price, D.C. 1964. *Clin. Chem.* 10, 21-31.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., e Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
10. Lampreia, J., Moura, I., Xavier, A.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., e Moura, J.J.G. 1990. In "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes", Ed. F. Müller, Vol. III págs. 333-355, CRC Press.
11. Rao, N.A., Felton, S.P., e Huennekens, F.M. 1967. *Methods in Enzymology* 10, 494-499.
12. Bowen, T.J., Happold, F.C., e Taylor, B.F. 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 566-576.
13. Lyric, R.M., e Suzuki, I. 1970. *Can. J. Biochem.* 48, 344-354.
14. Bramlett, R.N. 1973. Tese de Doutotamento, Universidade da Georgia.
15. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr, LeGall, J., Huynh, B.H., e Moura, J.J.G. 1990. *Eur. J. Biochem.* 188, 653-664.
16. Wolfgang, S., e Trüper, H.G. 1984. *Arch. Microbiol.* 137, 145-150.

17. Peck, H.D., Jr., Deacon, T.E., e Davidson, J.T. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 96, 429-446.
18. Trüper, H.G., e Rogers, L.A. 1971. *J. Bacteriol.* 108, 1112-1121.
19. Martinez, A., Olafsdottir, S., Haavik, J., e Flatmark, T. 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 92-98.
20. Lampreia, J., Fauque, G., Speich, N., Dahl, C., Moura, I., Trüper, H.G., e Poura, J.J.G. 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 342-347.
21. Swoboda, B.E.P., e Massey, V. 1969. *J. Biol. Chem.* 244, 3999-4006.
22. Meyer, T.E., Bartsch, R.G., e Cusanovich, M.A. 1991. *Biochem.* 30, 8840-8845.
23. Michaels, G.B., Davidson, J.T., e Peck, H.D., Jr. 1970. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 321-328.
24. Huynh, B.H., Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. 1980. *J. Biol. Chem.* 255, 3242-3244.
25. Cammack, R., Dickson, D.P.E., e Johnson, C.E. 1977. In "Iron-sulfur proteins", Ed. W. Lovenberg, Vol. III págs. 283-327, Academic Press.
26. Massey, V. 1990. In "Flavins and flavoproteins: proceedings of the tenth internacional symposium on flavins and flavoproteins", Ed. B. Curti, S. Ronchi e G. Zanetti, págs. 59-66, Water de Gruyter Berlin, new York.
27. Beckmann, J.D., e Frerman, F.E. 1985. *Biochem.* 24, 3913-3921.
28. Patil, D.S., Moura, J.J.G., He, S.H., Teixeira, M., Prickril, B.C., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., e Huynh, B.H. 1988. *J. Biol. Chem.* 263, 18732-18788.
29. Stankovich, M.T., e Steenkamp, D.J. 1987. In "Flavins and Flavoproteins", Ed. D.E. Edmonson e D.B. Cormick, págs. 687-690, Gruyter, Berlim.
30. Boyer, P.D. 1954. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4331-4337.
31. Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B298, 443-466.

32. Emptage, M.K., Kent, T.A., Huynh, B.H., Rawlinhgs, J., Orme Johnson, W.H, e Münck, E. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**, 1793-1796.
33. Lampreia, J., Pereira, A.S., e Moura, J.J.G. 1994. *Methods in Enzymology*, em impressão.
34. Barber, M.J., Neame, P.J., lim, L.W., White, S., e Mathews, F.S. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**, 6611-6619.
35. Bramlett, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**, 2979-2986.
36. Verhagen, M.F.J.M., Kooter, I.M., Wolbert, R.B.G., e Hagen, W.R. 1994. *Eur. J. Biochem.* **221**, 813-837.
37. Chen, L., LeGall, J., e Xavier, A.V. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 839-844.

CAPÍTULO V

A INTERACÇÃO DE PEQUENAS MOLÉCULAS COM A REDUTASE DO APS DE *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* ATCC 2774

V. A interacção de pequenas moléculas com a redutase do APS de D. desulfuricans ATCC 27774.

1. Introdução	191
2. A interacção do NO com a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	194
2.1. Adição de NO à enzima parcialmente reduzida	194
2.2. Adição de NO à enzima totalmente reduzida	198
2.3. Adição de NO à enzima reagida com sulfito e AMP	200
3. Interacção do NO com a ferredoxina I e a ferredoxina II de <i>D. gigas</i>	202
4. Estudo de um composto modelo para a interacção do NO com proteínas de ferro-enxofre	205
4.1. Espectros de RPE à temperatura ambiente	206
4.2. Espectros de RPE a baixa temperatura	208
5. Discussão	213
6. A interacção do cianeto com a redutase do APS de <i>D. desulfuricans</i>	215
6.1. O efeito do cianeto no espectro de visível	215
6.2. O efeito do cianeto no espectro de RPE	217
7. Discussão	221
8. Bibliografia	223

V.1. Introdução

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena, relativamente instável, com importantes implicações ambientais e biológicas. Durante muito tempo foi considerado como um produto lateral, altamente reactivo, na queima de combustíveis fósseis, contribuindo para a formação da chuva ácida, e portanto, para o aumento da poluição. Do ponto de vista biológico, a ocorrência da molécula de NO esteve, durante muito tempo, limitada ao processo de desnitrificação bacteriana, uma reacção intermediária do ciclo do azoto. Na última década, os avanços tecnológicos nas áreas da toxicologia, da imunologia, da farmacologia cardiovascular e da neurobiologia, contribuíram para o aumento do interesse nesta pequena molécula. Assim, foi descoberta a biossíntese de NO a partir da L-arginina, em células animais. Esta via metabólica, catalisada por sintetases do NO, tem implicações em várias funções biológicas, incluindo a vasodilatação, neurotransmissão e agregação das plaquetas sanguíneas, através da activação da ciclase do guanilil produzida no citoplasma.^{1,2,3,4}

Do ponto de vista bioquímico, a produção de NO em células animais específicas tem como consequência a inibição, parcial ou total, de enzimas envolvidas: *i)* na cadeia de transporte electrónico, incluindo os Complexos I e II e provavelmente IV, *ii)* no ciclo do ácido cítrico, a nível da aconitase, bem como *iii)* no metabolismo do ferro, a nível da ferritina, transferrina e da IRE-BP (ver Figura V.1).^{5,6} Tem sido sugerido que a inibição resulta de uma alteração conformacional do sítio activo destas enzimas, devida à ligação do NO aos átomos de ferro dos centros activos. No caso da aconitase, pensa-se que o NO afecta o equilíbrio entre as formas com e sem agregados (forma apo) e consequentemente, o controlo da função da aconitase/IRE-BP.⁷

O NO é uma molécula que apresenta uma elevada afinidade para metais de transição, em particular para o ferro e o cobre. A interacção do NO com proteínas de ferro-enxofre foi descrita pela primeira vez na desidrogenase do succinato, por Salerno e colaboradores, em 1976.⁸ Pela aplicação da espectroscopia de RPE, os autores caracterizaram espectroscopicamente o complexo proteína-NO, com a finalidade de

determinar o número e o arranjo estrutural dos átomos de ferro presentes. O sinal de RPE obtido apresentava uma forma axial, com valores de g a 2.035 e 2.010. Este mesmo sinal foi, mais tarde, detectado nas nitrogenases de *Clostridium botulinum* e *Rhodopseudomonas sphaeroides*, após tratamento com NO.^{9,10} De então e até à data, muito tem sido publicado, sobre a reactividade do NO em proteínas de ferro-enxofre ou em compostos modelo. Do artigo de revisão publicado por Henry e colaboradores, pode concluir-se que os complexos de NO com proteínas que possuem agregados ferro-enxofre do tipo [4Fe-4S] e [3Fe-4S] são caracterizados por sinais de RPE semelhantes ao observado na desidrogenase do succinato.¹¹ A mesma espécie pode, também, ser obtida pela reacção de ácidos aminados que contêm grupos -SH com ferro (II) e nitrito de sódio, em condições redutoras e a pH ~ 6.0.^{12,13}

Neste capítulo apresenta-se o estudo da interacção destas moléculas (NO e CN⁻) com proteínas de ferro-enxofre, nomeadamente com a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 e com as ferredoxinas I e II de *D. gigas* e de um composto modelo de Fe(II), cisteína e nitrito/ditionito de sódio.

Apesar de ser conhecido o potencial do CN⁻ como um ligando forte de agregados ferro-enxofre, muito pouco trabalho se encontra documentado nesta área. Devido às suas propriedades tem sido usado extensivamente como um inibidor da actividade de várias proteínas que contêm metais, nomeadamente ferro, organizado em agregados de ferro-enxofre. Verificou-se que esta molécula inibe a actividade da desidrogenase do CO, da hidrogenase de *A. vinelandii* e de outras proteínas de ferro-enxofre.^{14,15} Por outro lado, o cianeto pode ser um substrato da nitrogenase, uma proteína de ferro-enxofre que intervém no ciclo do azoto.¹⁶

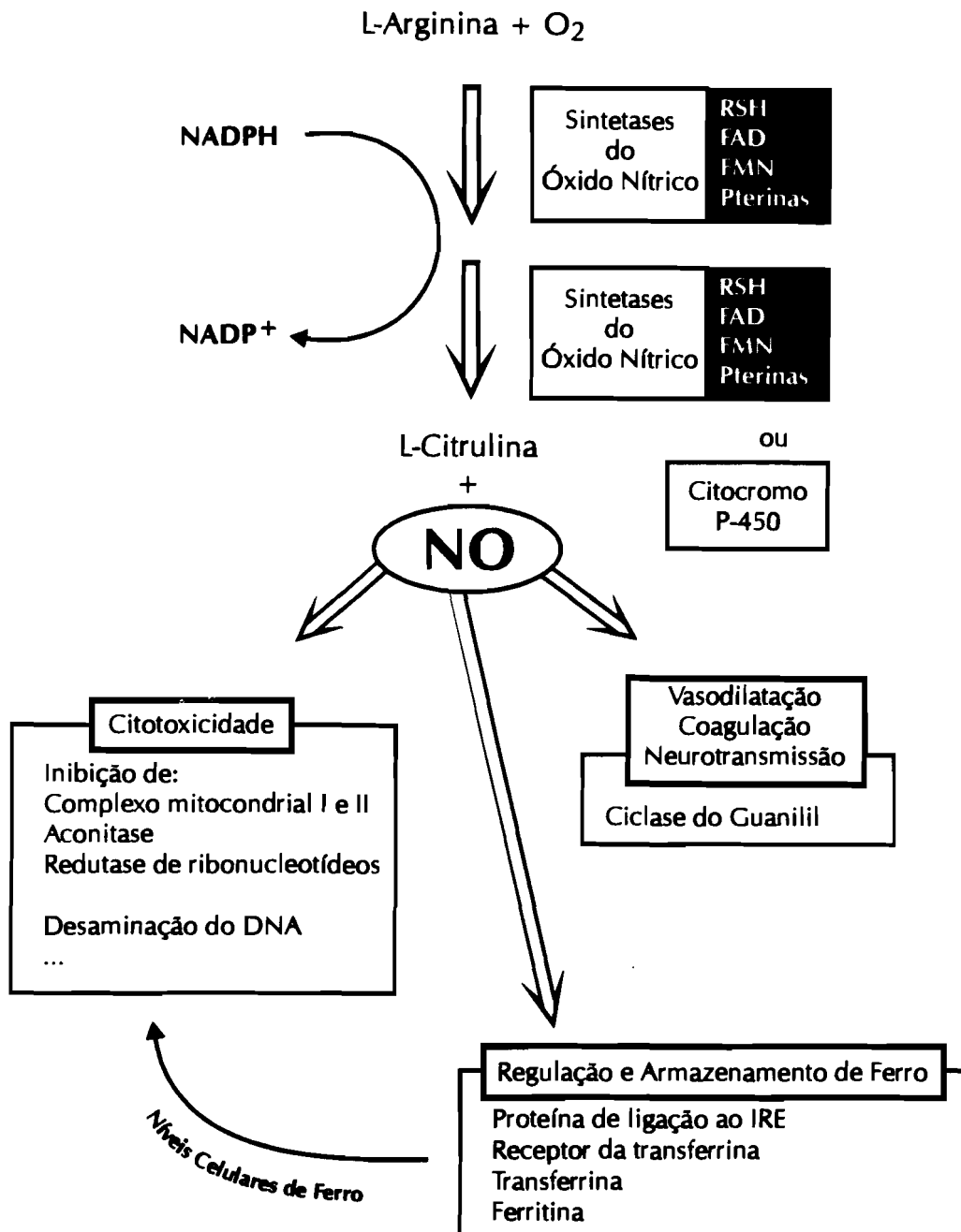


Figura V.1. O papel do NO nos sistemas biológicos (adaptado da referência 11).

V.2. A interacção do NO com a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774

V.2.1. Adição de NO à enzima parcialmente reduzida

Uma amostra de redutase do APS parcialmente reduzida com ditionito (pH ~ 9.0, $t < 1$ min.) foi incubada com NO, pela adição de 10 μ l do gás a 200 μ l de proteína (directamente no tubo de RPE) sob uma atmosfera de argon. Os espectros de RPE desta amostra, traçados em diferentes condições, estão representados na Figura V.2. Os espectros mostram que a adição de NO origina o aparecimento de um sinal com forma axial, detectável a temperaturas superiores a 40 K sem alargamento significativo das linhas. O espectro de RPE adquirido a 10 K, apresenta o sinal rômbico do centro I na forma reduzida ($g=2.084, 1.944$ e 1.90) e um sinal induzido pela adição de NO à enzima (Figura V.2B). A temperaturas superiores a 40 K, obtém-se um espectro constituído unicamente pelo sinal devido à adição de NO à proteína. Este sinal é caracterizado por valores de $g_{//}=2.037$ e $g_{\perp}=2.018$ (normalmente denominado na literatura por sinal " $g=2.04$ "), tal como se pode observar no espectro E da Figura V.2.⁶ As larguras de cada linha, calculadas por simulação do sinal, são iguais a 21 G e 11 G, respectivamente. A quantificação dos sinais de RPE, por integração dupla, indica que a espécie induzida pelo NO representa, a 45 K, 0.6 spins/molécula.

A dependência da temperatura da amostra assim tratada, revela que com o aumento da temperatura a intensidade do sinal do centro I diminui, deixando de ser detectado a valores de temperatura superiores a 30 K (Figura V.3.1). Por outro lado, verifica-se que a temperatura óptima de detecção do sinal " $g=2.04$ " se encontra entre os 35 e 60 K, atingindo a sua intensidade máxima a cerca de 45 K (Figura V.3.3). A dependência deste sinal em função da potência de radiação da micro-onda aplicada, para uma temperatura de 40 K, está representada na Figura V.3.2.

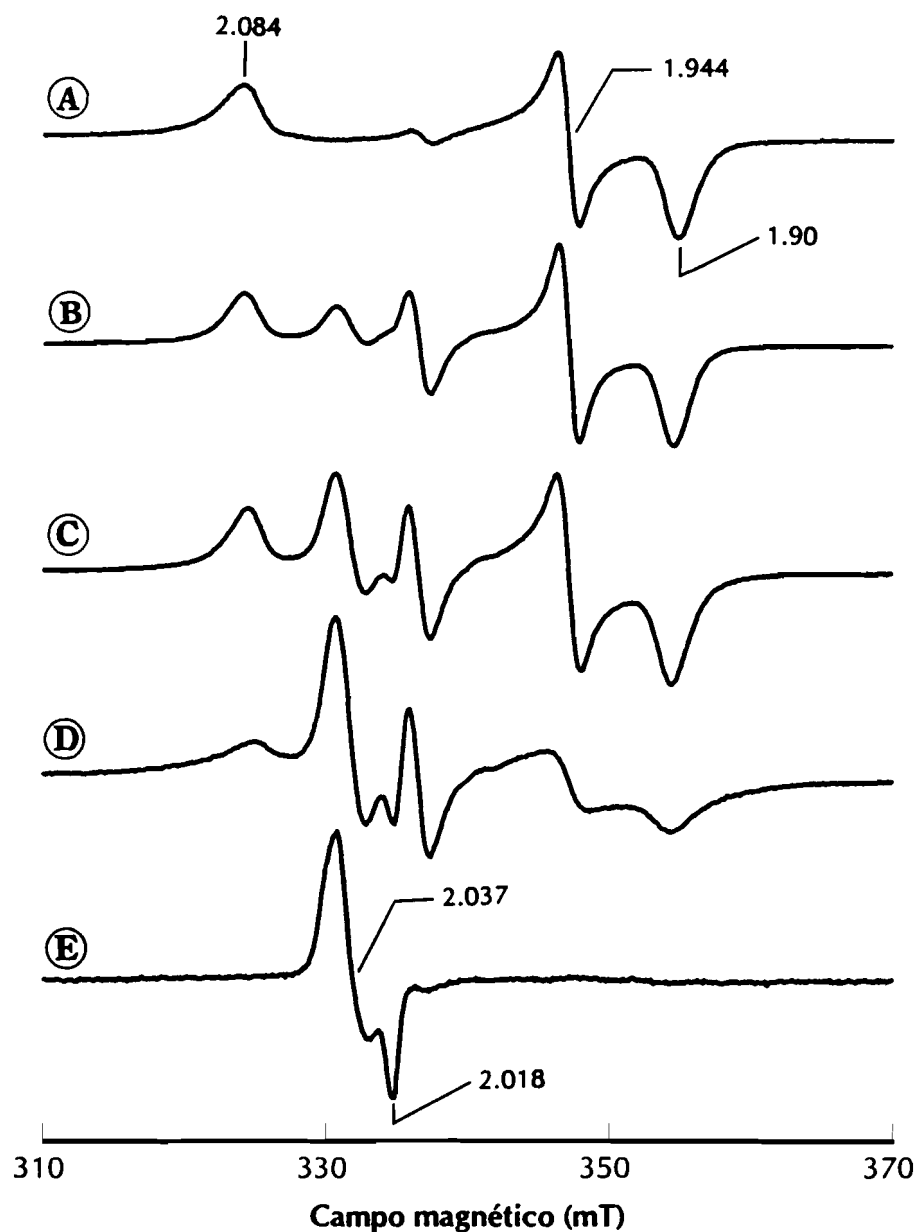


Figura V.2. O efeito do NO no espectro de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* no estado semi-reduzido. Espectro (A), enzima parcialmente reduzida (0.1 M ditionito, pH ~ 9.0, $t < 1$ min.) a 10 K; (B), enzima parcialmente reduzida reagida com NO (10 μ l) a 10 K; (C), amostra anterior a 16 K; (D), amostra (B) a 20 K; (E), amostra (B) a 45 K. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.455 GHz, potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .

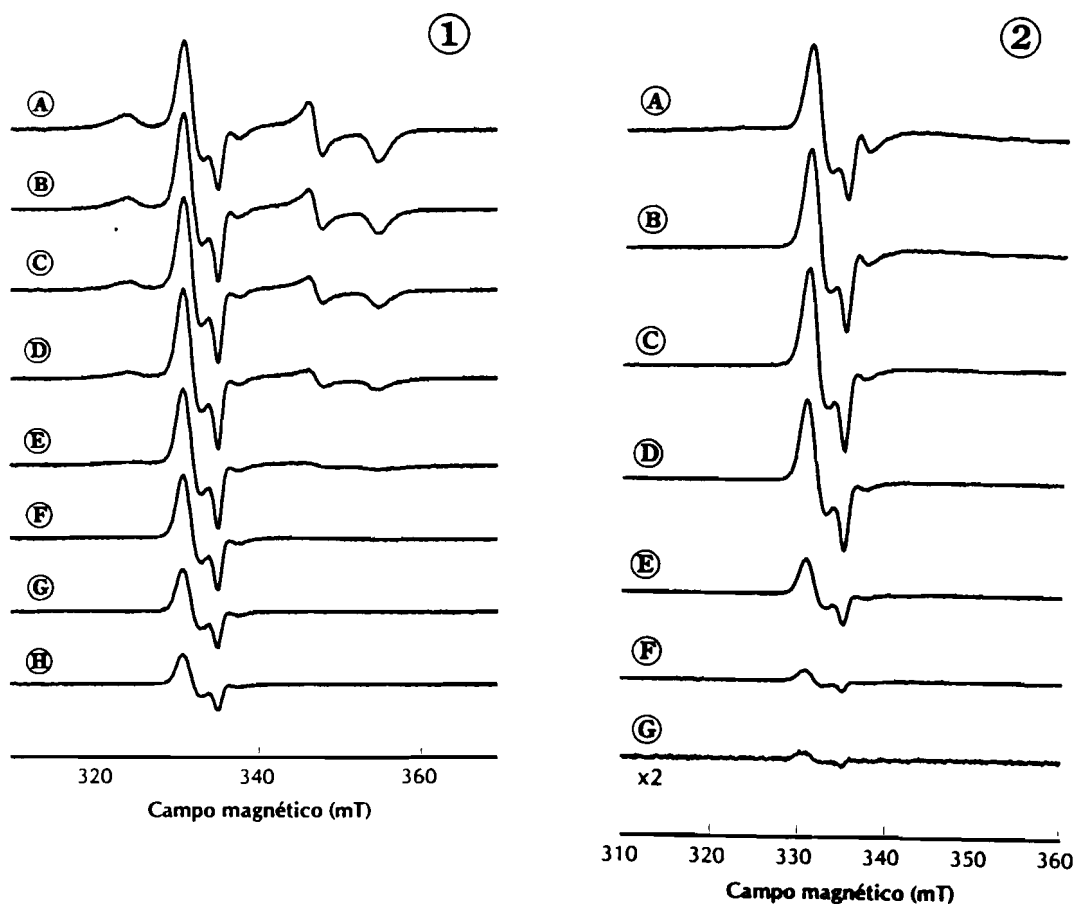
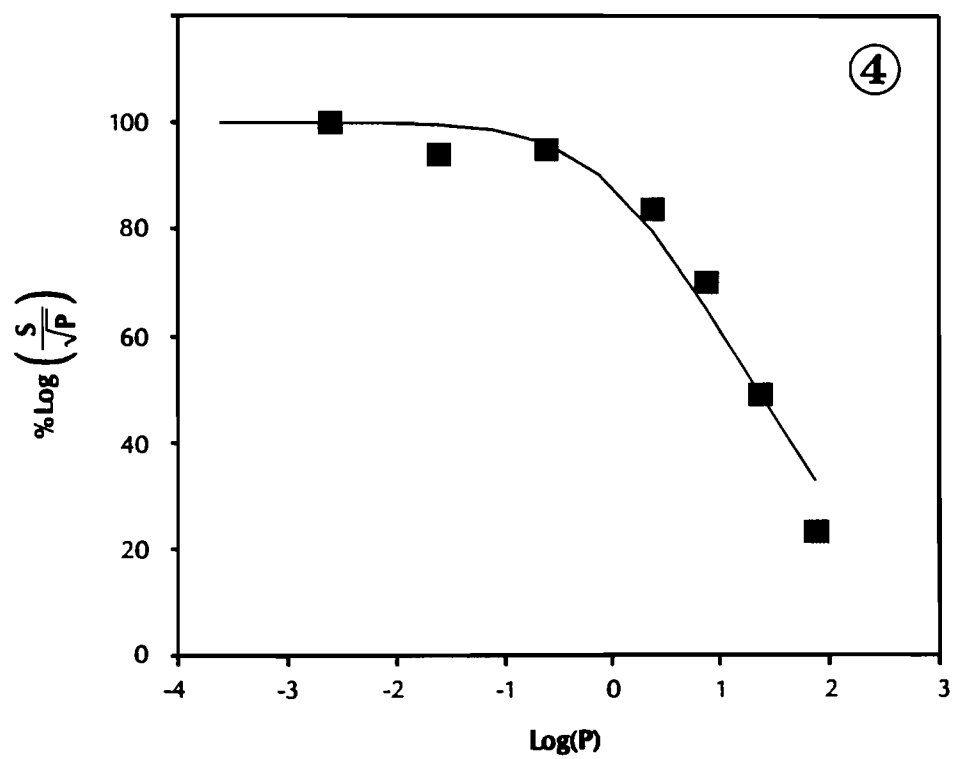
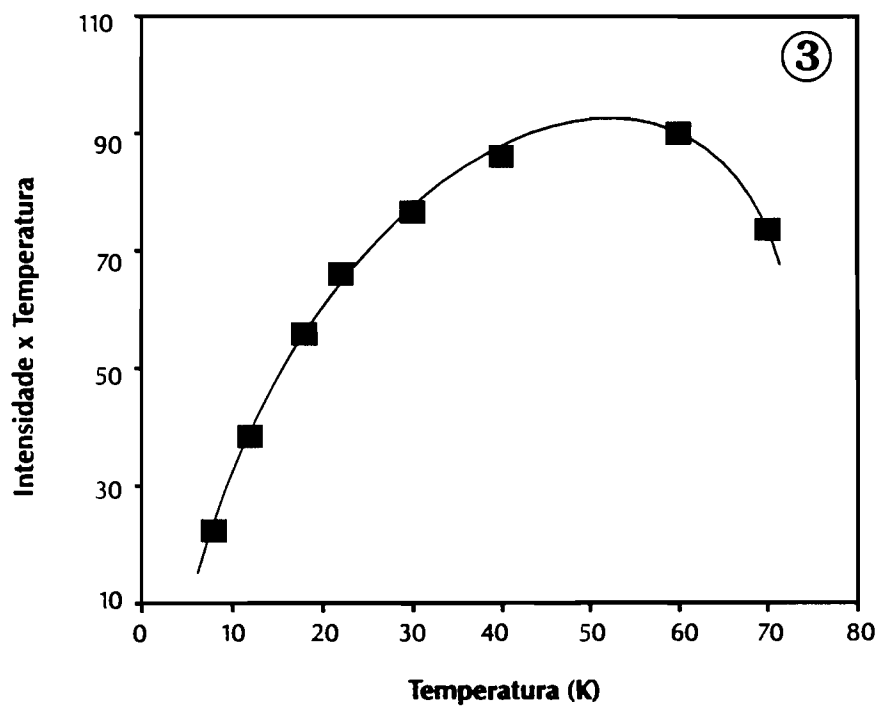


Figura V.3. Dependência da temperatura e da potência do sinal induzido pelo NO na redutase do APS semi-reduzida. ① dependência da temperatura a uma potência aplicada de 0.2 mW: (A), 8 K; (B), 12 K; (C), 18 K; (D), 22 K; (E), 30 K; (F), 40 K; (G), 60 K; (H), 70 K; ② dependência com a potência aplicada, a 40 K: (A), 63.2 mW; (B), 20.0 mW; (C), 6.3 mW; (D), 2.0 mW; (E), 0.2 mW; (F), 0.02 mW; (G), 0.002 mW; ③ representação gráfica da variação da intensidade do sinal induzido pelo NO com a temperatura; ④ representação gráfica da variação da intensidade do sinal induzido pelo NO com a potência. Condições experimentais: temperatura em ② e ④, 40 K; frequência da micro-onda, 9.45 GHz, potência da micro-onda ① e ③ 0.2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .



A Figura V.3.4 mostra o ajuste dos pontos experimentais a uma curva teórica, aplicando a equação de Beinert:^{17,18}

$$S / \sqrt{P} \propto 1 / \left[1 + \frac{P}{P_{1/2}} \right]^{b/2}$$

em que S é a intensidade do sinal, P a potência da radiação da micro-onda, $P_{1/2}$ a potência de meia saturação e b o parâmetro de não homogeneidade, que mede a anisotropia do sistema. Para uma melhor visualização dos resultados, optou-se por representar o $\log(S/\sqrt{P})$ em função do $\log P$.

Os parâmetros de saturação obtidos para o sinal induzido pela adição de NO à redutase do APS, a 40 K, são os seguintes: $P_{1/2}=0.8$ mW e de $b=3.4$ (para o sinal a $g=2.018$). A curva de saturação mostra ainda, que o sinal " $g=2.04$ " satura para valores de potência da micro-onda aplicadas superiores a 0.2 mW.

Se a adição de NO for efectuada antes da redução da proteína, obtém-se um espectro de RPE análogo ao anteriormente observado, indicando que a ordem de adição não tem qualquer efeito na interacção do NO com a redutase do APS.

V.2.2. Adição de NO à enzima totalmente reduzida

O resultado da incubação da redutase do APS totalmente reduzida (0.1 M ditionito pH ~ 9.0, $t > 15$ min.) está representado na Figura V.4. Verifica-se que a adição de NO à enzima origina o desaparecimento do sinal de RPE característico da interacção entre os centros I e II, visíveis antes da incubação (Figura V.4A). O espectro de RPE, adquirido a 10 K (Figura V.4B), exibe três sinais associados a espécies distintas: um sinal rômboico com valores de g típicos do centro I ($g=2.089$, 1.948 e 1.905), um sinal axial devido à interacção do NO ($g_{//}=2.037$ e $g_{\perp}=2.018$) com a enzima e um terceiro sinal radicalar devido a um ligeiro excesso de NO na amostra ($g=2.006$).

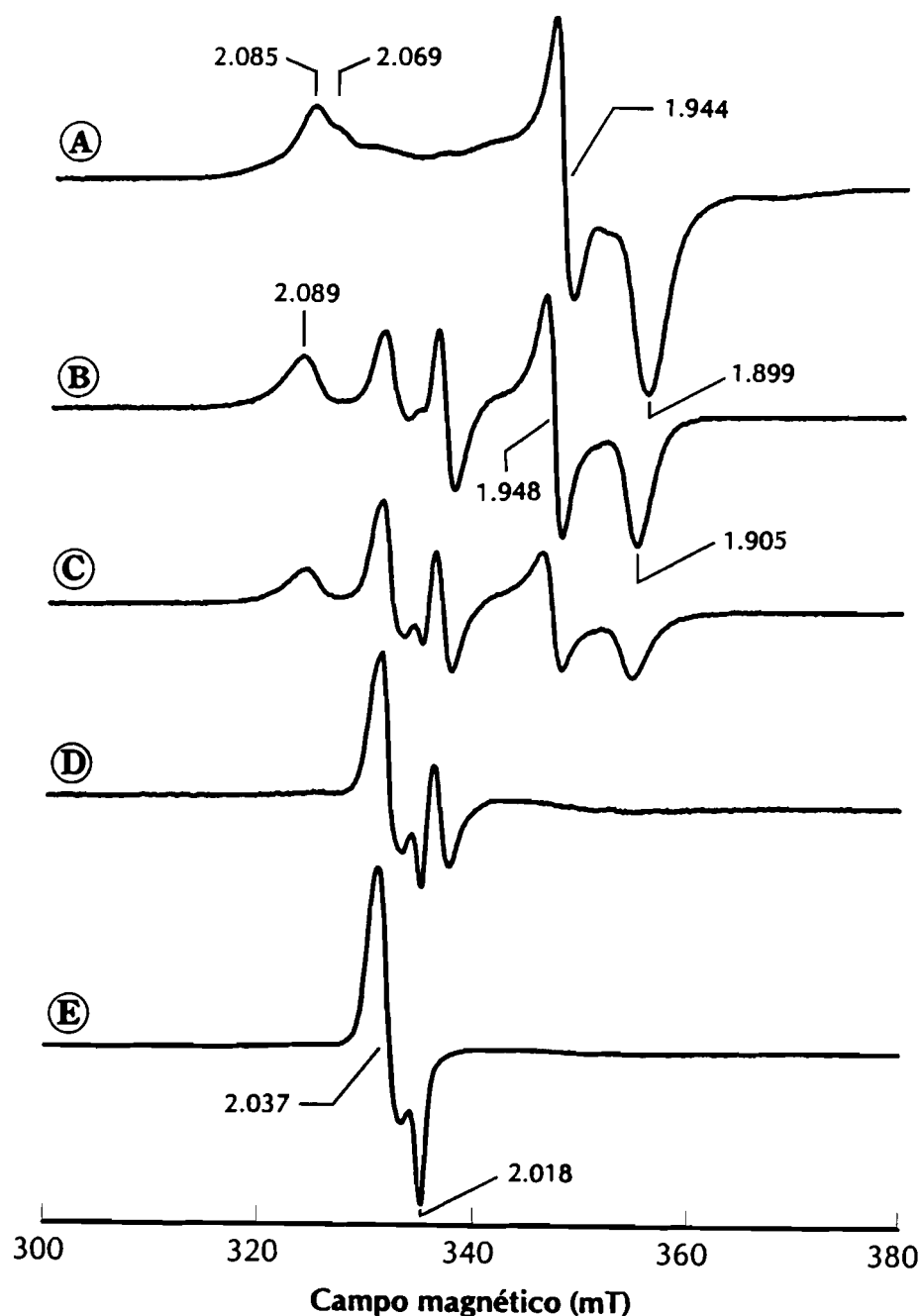


Figura V.4. O efeito do NO na redutase do APS de *D. desulfuricans* no estado totalmente reduzido. (A), enzima totalmente reduzida com ditionito (0.1 M, pH ~ 9.0, t > 15 min.) a 10 K; (B), enzima totalmente reduzida reagida com NO, a 10 K; (C), amostra (B) a 20 K; (D), amostra (B) a 30 K; (E), amostra (B) a 45 K. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 0.2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .

O sinal induzido pelo NO apresenta propriedades electromagnéticas semelhantes à espécie observada quando da interacção do NO com a redutase parcialmente reduzida, o que sugere que a molécula de NO interacciona do mesmo modo em ambos os casos. Tal como anteriormente, o aumento da temperatura origina a saturação do sinal rômboico, detectando-se apenas a espécie proveniente da interacção com o NO (Figura V.4D). A quantificação das diferentes espécies revela que nesta amostra, o sinal associado ao NO, representa aproximadamente 0.75 spins/molécula, a 45 K.

V.2.3. Adição de NO à enzima reagida com sulfito e AMP

Contrariamente aos casos anteriormente descritos, a adição de NO a uma amostra de redutase do APS previamente incubada com os substratos naturais da enzima, sulfito e AMP, não produz a espécie de RPE habitualmente detectada a " $g=2.04$ ", como se pode observar na Figura V.5. No entanto, verifica-se que a incubação com NO produz o desaparecimento total do sinal "isotrópico", a $g=2.025$, atribuído ao agregado $[3Fe-4S]$ (ver capítulo anterior). De salientar ainda, que a intensidade do sinal rômboico ($g=2.092$, 1.946 e 1.90), resultante da interacção dos substratos com o centro I, não diminui, sugerindo que os substratos exercem um efeito protector neste centro I.

Este resultado sugere que a molécula de NO reage especificamente com o centro I da redutase do APS, na medida em que a presença dos substratos naturais (sulfito e AMP) parece proteger o agregado $[4Fe-4S]$, impedindo a formação da espécie " $g=2.04$ ". Assim, a interacção do NO com a enzima reagida com sulfito e AMP parece provocar uma alteração do estado de oxidação do agregado $[3Fe-4S]$, sem a formação da espécie que produz o sinal a " $g=2.04$ " (ver interacção do NO com a ferredoxina II, na secção seguinte).

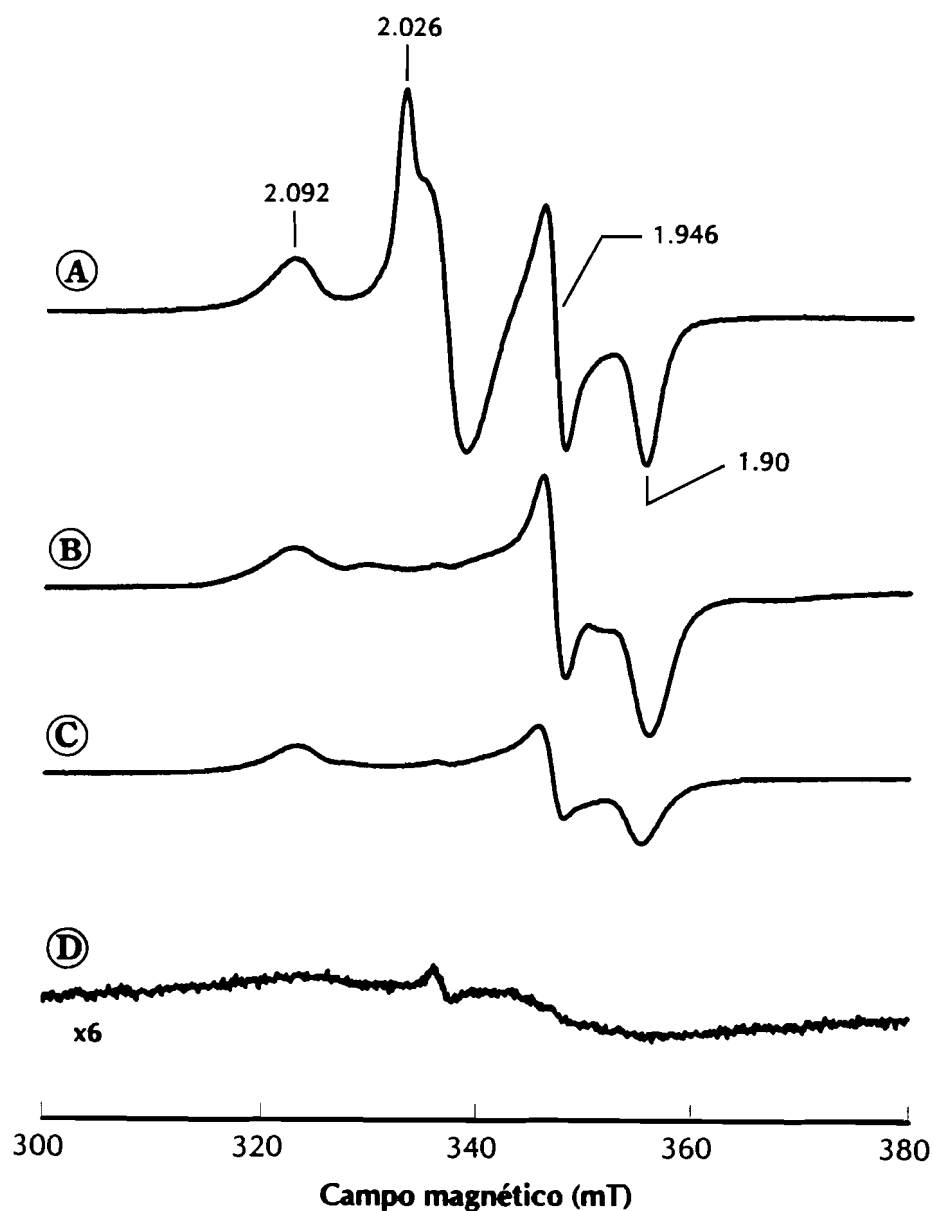


Figura V.5. Efeito do NO na redutase do APS reagida com sulfito e AMP. (A), enzima reagida com sulfito e AMP a 10 K; (B), enzima reagida com sulfito e AMP mais NO, a 10 K; (C), amostra anterior traçada a 20 K; (D), amostra (B) a 45K. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 0.2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .

V.3. *Interacção do NO com a ferredoxina I e a ferredoxina II de D. gigas*

As ferredoxinas I e II são proteínas de ferro-enxofre que contêm um único agregado [4Fe-4S] e [3Fe-4S], respectivamente, envolvidos por uma cadeia polipeptídica de cerca de 6.0 kDa. Devido à sua "simplicidade" em termos do conteúdo em agregados de ferro-enxofre, estas proteínas foram usadas como "modelos" para a redutase do APS, no estudo da interacção com pequenas moléculas.

A adição de NO (10 µl de NO gasoso) à ferredoxina I (175 µM em ~200 µl) reduzida com ditionito origina a formação do sinal de NO anteriormente detectado na redutase do APS (Figura V.6).

O sinal de RPE observado, com valores de g a 2.032 e 2.015, apresenta propriedades de saturação em função da potência da micro-onda e da temperatura, semelhantes à espécie análoga obtida pela incubação da redutase do APS com NO no estado semi-reduzido. Por quantificação, verificou-se que o sinal associado ao NO representa 0.68 spin/molécula.

A incubação da ferredoxina II reduzida (com ditionito) com uma baixa concentração de NO produziu um sinal rômboico com valores de g iguais a 2.04, 2.01, 1.97. A simulação deste sinal mostra que as larguras de linha são iguais a 17.4, 6.4 e 25 G, respectivamente (Figura V.7B). Se a esta amostra se adicionar mais NO, obtém-se o sinal axial observado na ferredoxina I e na redutase do APS (Figura V.7C). A quantificação das espécies induzidas pelo NO revela que sinal rômboico contribui com 0.88 spins/molécula, enquanto que o sinal axial representa 0.73 spins/molécula.

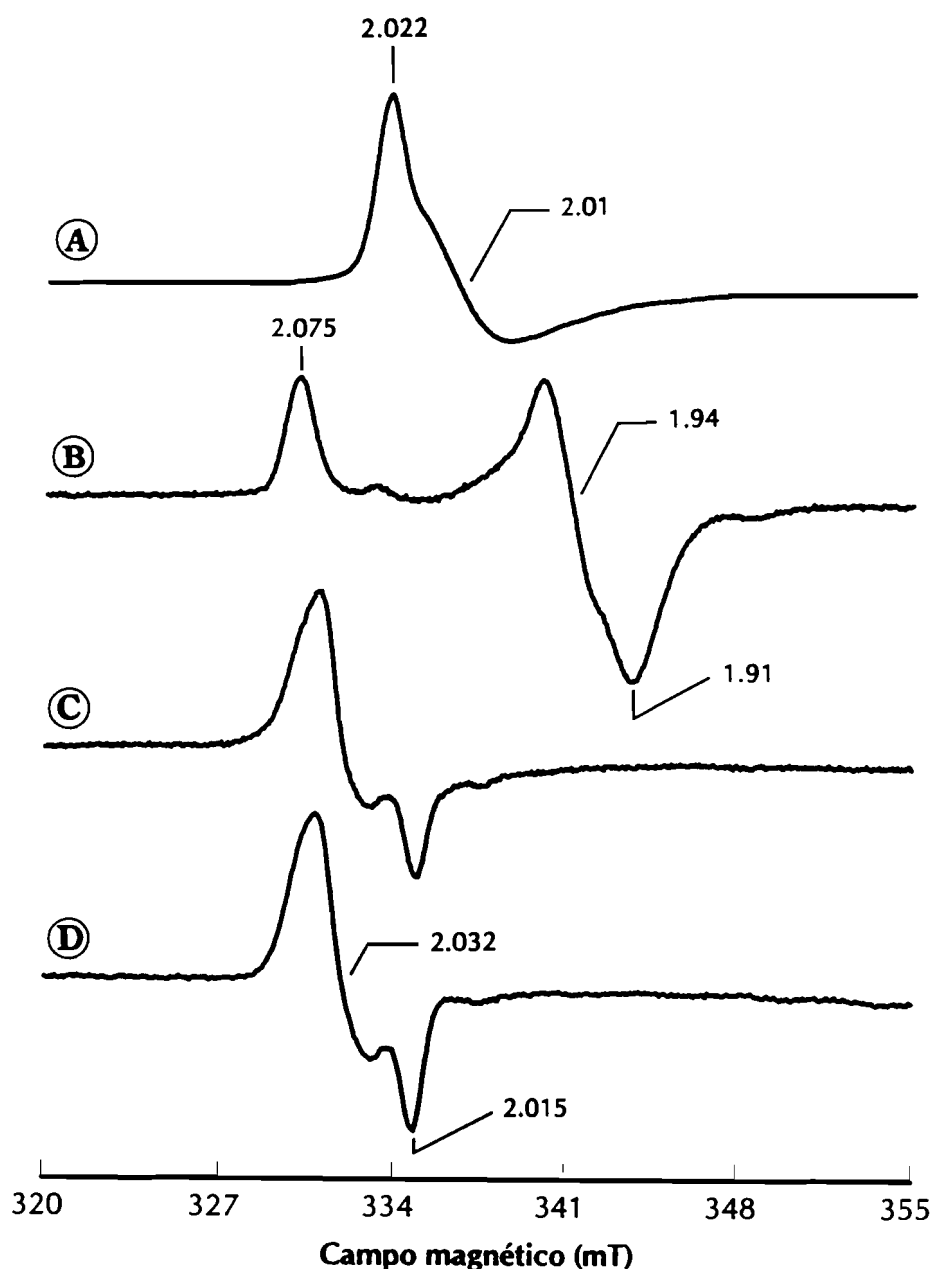


Figura V.6. Efeito do NO na ferredoxina I de *D. gigas*. (A), proteína nativa; (B), proteína reduzida com ditionito; (C), proteína reduzida reagida com NO, a 10 K; (D), amostra anterior a 45K. Condições experimentais: temperatura, 10 K excepto quando mencionado em contrário; frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 8×10^3 .

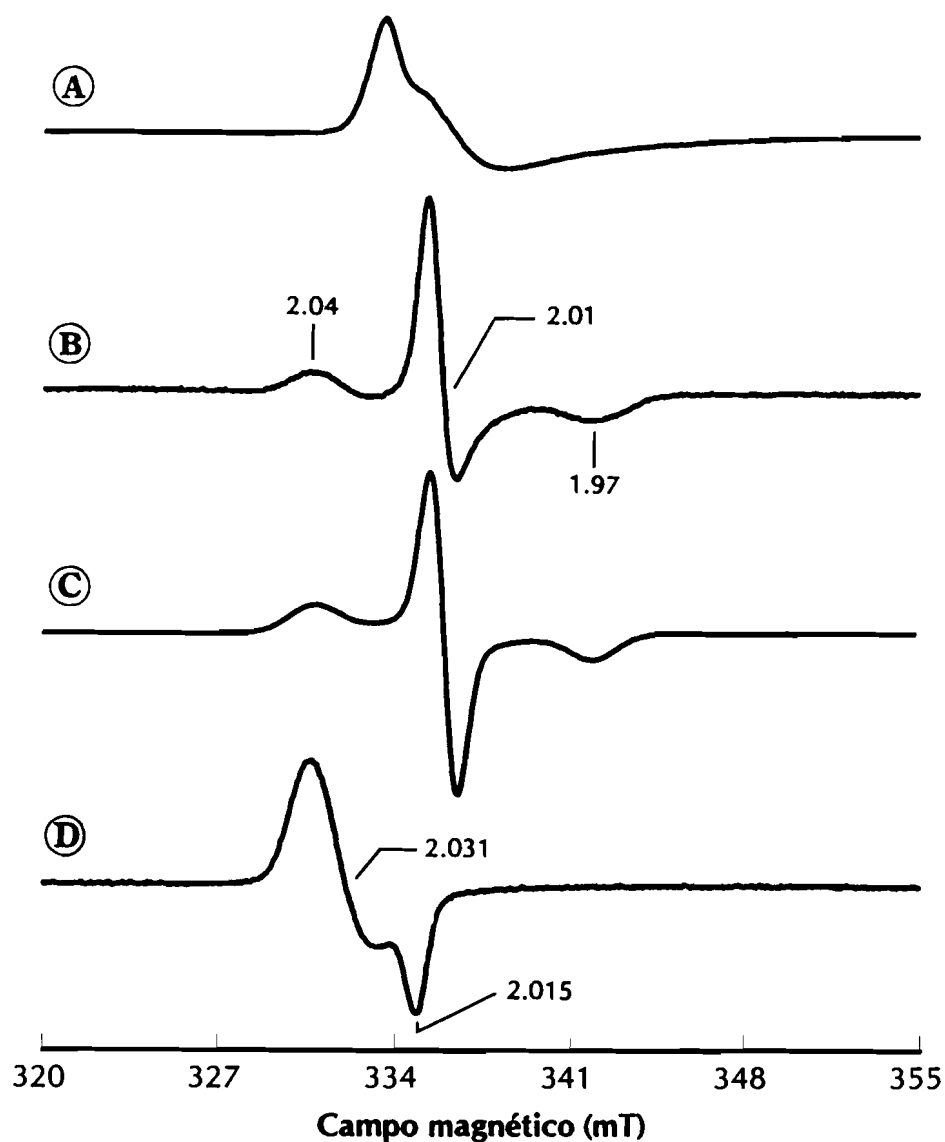


Figura V.7. Efeito do NO na ferredoxina II de *D. gigas*. (A), proteína nativa; (B), proteína reduzida com ditonito e reagida com NO (concentração baixa); (C), simulação do sinal anterior; (D), adição de mais NO à amostra anterior. Condições experimentais: temperatura, 10 K excepto espectro (D) que foi adquirido a 45 K; frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 8×10^3 .

V.4. Estudo de um composto modelo para a interacção do NO com proteínas de ferro-enxofre

Com o objectivo de se esclarecer o tipo de interacção entre o NO e os agregados ferro-enxofre das proteínas acima mencionadas, foi sintetizado um composto inorgânico de ferro (II), cisteína e NO, como modelo de trabalho.

O composto modelo foi obtido seguindo o método de McDonald e colaboradores.¹² Preparou-se uma solução aquosa de cisteína (30 mg/ml), ácido ascórbico (30 mg/ml) e sulfato de ferro (1.5 mM) num volume total de 1 ml; ajustou-se o pH a aproximadamente 6.0 com NaOH e/ou HCl e, por último, juntou-se nitrito de sódio (20 mg/ml). Deixou-se reagir a mistura durante 5 minutos à temperatura ambiente. Ao longo da reacção, verifica-se que a solução adquire uma coloração esverdeada, indicativo da formação de um complexo entre os iões ferrosos e o NO. O composto modelo tem um tempo de vida de 15 a 20 minutos (período de tempo após o qual o composto começa a precipitar).

A síntese do composto modelo com ¹⁵NO₂⁻ foi efectuada por adição de nitrito de sódio 97% enriquecido em ¹⁵N (*Aldrich*). A preparação com ⁵⁷Fe foi efectuada substituindo o sulfato de ferro por ~ 80 µl de uma solução de ⁵⁷Fe a uma concentração de 18.6 mM.

Para a obtenção dos espectros de RPE traçados à temperatura ambiente, usou-se uma célula de quartzo plana com 1 mm de espessura; os espectros adquiridos às restantes temperaturas foram obtidos por medida da solução aquosa do composto em tubos de quartzo calibrados e congelados imediatamente em azoto líquido.

V.4.1. Espectros de RPE à temperatura ambiente

Os espectros de RPE do composto modelo preparado em ^{14}NO e ^{15}NO , traçados à temperatura ambiente, estão representados na Figura V.8.

O espectro do composto preparado com ^{14}NO mostra um sinal com $g_{\text{médio}} = 2.032$, com uma estrutura hiperfina complexa, constituída por 13 linhas equitativamente separadas (Figura V.8A). O espectro do composto enriquecido com ^{15}NO , exibe um menor número de linhas, 9 linhas, com maior desdobramento hiperfino e maior largura de linha (Figura V.8C).

A simulação dos sinais de RPE foi possível, assumindo uma espécie constituída por um átomo de ferro coordenado por dois grupos de NO e dois grupos de enxofre pertencentes a duas moléculas de cisteína, dispostos numa geometria tetraédrica, estruturalmente muito semelhante à do sal de Roussin. Para além dos desdobramentos hiperfinos associados ao átomo de azoto dos grupos NO (que são magneticamente equivalentes), outros contribuem para a estrutura hiperfina, resultantes da proximidade dos prótons $\beta\text{-CH}_2$ da cisteína ao átomo de ferro. Os parâmetros usados nas simulações dos espectros são apresentados na Tabela V.1.

O número de linhas espectrais, bem como o aumento da constante de desdobramento hiperfino por um factor de 1.4 (a razão giromagnética entre o ^{14}N e o ^{15}N é igual a 1.403), quando se substitui o ^{14}N ($I=1$) por ^{15}N ($I=1/2$) demonstra que a estrutura hiperfina da espécie paramagnética do composto, a $\text{pH} \sim 6.0$, é originada pela interacção dos átomos de azoto dos grupos NO, bem como pela interacção dos prótons $\beta\text{-CH}_2$ dos resíduos de cisteína, com os átomos de ferro.

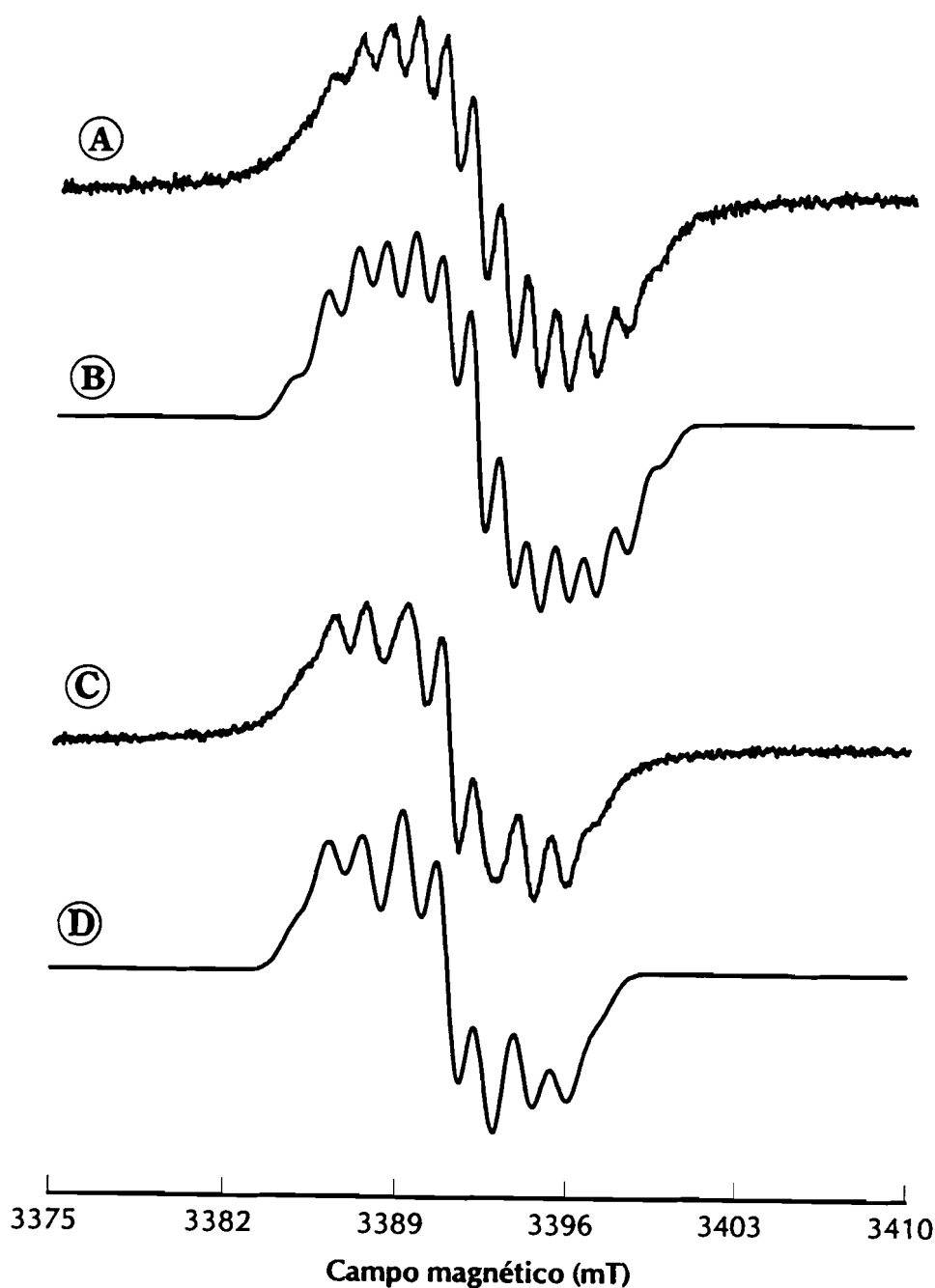


Figura V.8. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO, adquiridos à temperatura ambiente. (A), composto modelo preparado com $^{14}\text{NO}_2^-$; (B), simulação do espectro (A); (C), composto modelo preparado com $^{15}\text{NO}_2^-$; (D), simulação do espectro (C). Condições experimentais: temperatura, 293 K; frequência da micro-onda, 9.65 GHz; potência da micro-onda, 2.47 mW; modulação da amplitude, 0.01 mT; ganho, 1.25×10^4 .

Tabela V.1

Parâmetros usados na simulação dos espectros de RPE, traçados à temperatura ambiente, do composto modelo preparado em ^{14}N e ^{15}N

Parâmetros	^{14}NO	^{15}NO	H(cisteína)
Nº de núcleos	2	2	4
I_{N}	1	1/2	1/2
A (G)	2.27	3.15	1.28
Largura de linha (G)	1.35	1.6	—

V.4.2. Espectros de RPE a baixa temperatura

O espectro de RPE do composto modelo preparado com $^{14}\text{NO}_2^-$, adquirido à temperatura de 97 K, é apresentado na Figura V.9A. O espectro consiste de um sinal com forma axial situado a campo alto, com valores de g iguais a 2.034 e 2.014. Os valores da largura de cada linha foram determinados pela simulação do espectro, tendo-se obtido valores de 20.2 G e 10.0 G, respectivamente. Na mesma figura, apresenta-se também o espectro de RPE do composto sintetizado com o isótopo $^{15}\text{NO}_2^-$ (Figura V.9B). Neste caso, os valores das larguras de linha diferem ligeiramente, devido ao momento nuclear do ^{15}N , tendo-se obtido valores iguais a 19.2 G e 9.8 G.

Os espectros de RPE das mesmas preparações traçados a baixa temperatura, entre 8 K e 45 K, apresentam ressonâncias idênticas às observadas à temperatura do azoto líquido (Figura V.10). Para a simulação dos espectros assumiram-se valores de $g_{\parallel}=2.039$ e $g_{\perp}=2.016$. Os valores da largura de linha para o composto em ^{14}N são iguais a 22.0 G e 11.5 G, respectivamente, enquanto que para o composto em ^{15}N se obtiveram valores iguais a 23.0 G e 13 G.

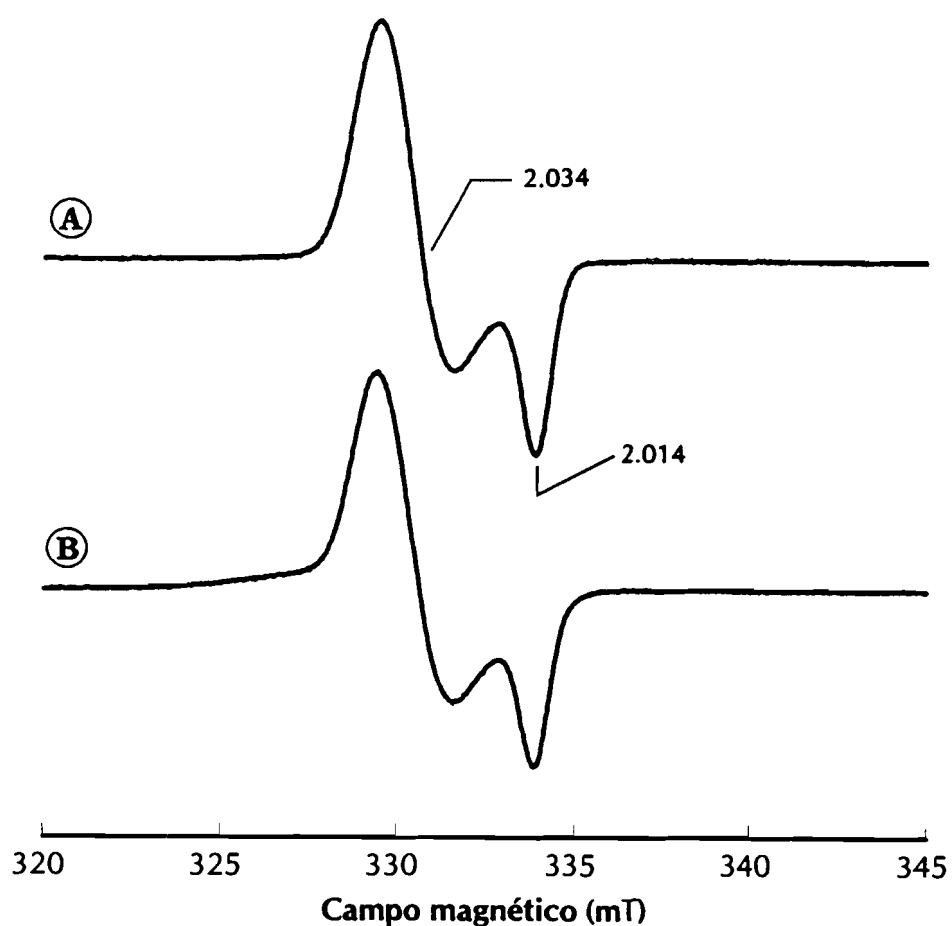


Figura V.9. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO, adquiridos à temperatura do azoto líquido. Composto preparado com $^{14}\text{NO}_2^-$ (A) e com $^{15}\text{NO}_2^-$ (B). Condições experimentais: temperatura, 97 K; frequência da micro-onda, 9.42 GHz; potência da micro-onda, 78.4 μW ; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 .

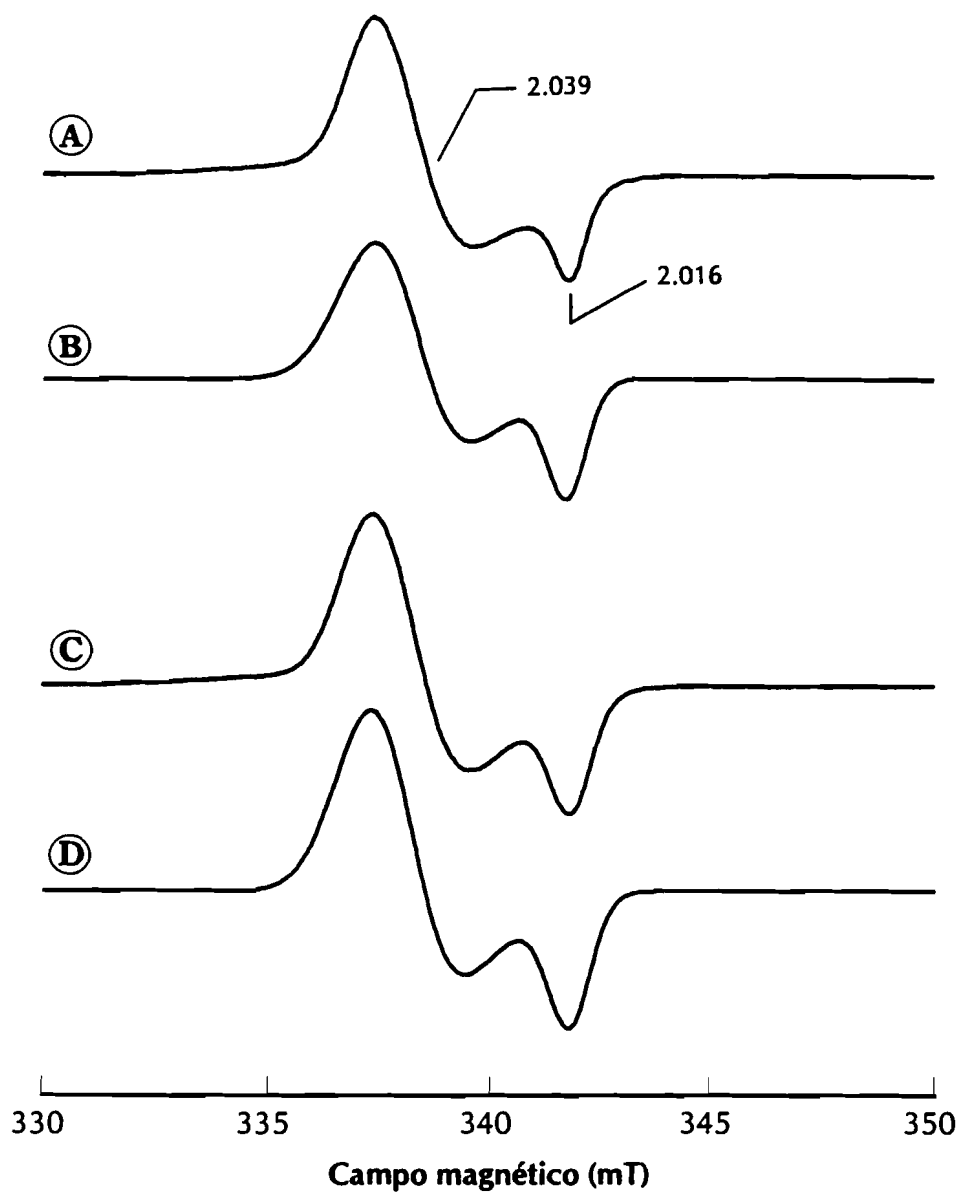


Figura V.10. Espectros de RPE do composto modelo Fe(II)-Cis-NO traçados a 45 K. (A), composto preparado com $^{14}\text{NO}_2^-$; (B), simulação do espectro (A); (C), composto preparado com $^{15}\text{NO}_2^-$; (D), simulação do espectro (C). Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.645 GHz; potência da micro-onda, 24.9 μW ; modulação da amplitude, 0.025 mT; ganho, 8×10^3 .

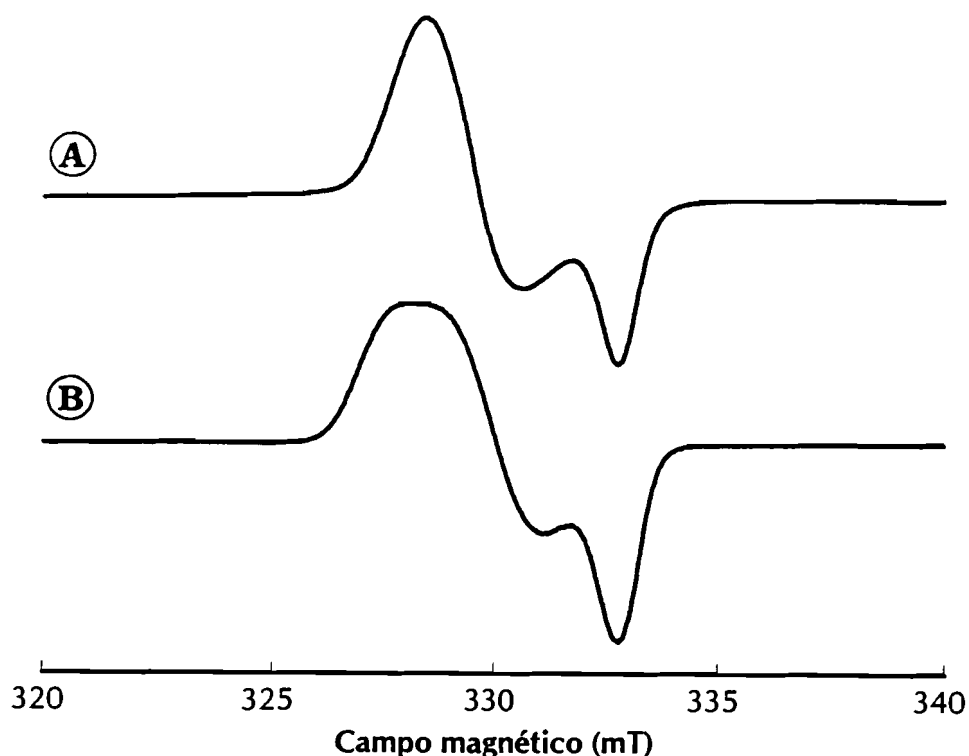


Figura V.11. Efeito da substituição isotópica com ^{57}Fe , no composto modelo Fe(II)-Cis-NO . (A), composto preparado com ^{56}Fe e (B), composto preparado com ^{57}Fe . Condições experimentais: temperatura, 45 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 63.24 μW ; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 6.3×10^3 .

O efeito da substituição isotópica do ^{56}Fe por ^{57}Fe no composto modelo está representado na Figura V.11. O alargamento da linha devido à substituição por ^{57}Fe demonstra claramente que os grupos NO se ligam a átomos de ferro.

Na Figura V.12 mostra-se a variação da intensidade do sinal de RPE do composto modelo com a potência da radiação da micro-onda, a várias temperaturas. Verifica-se que o sinal "g=2.04" induzido pelo NO apresenta propriedades de relaxação idênticas a 30 e 45 K, enquanto que a 8 K, o sinal satura a potências da micro-onda mais baixas.

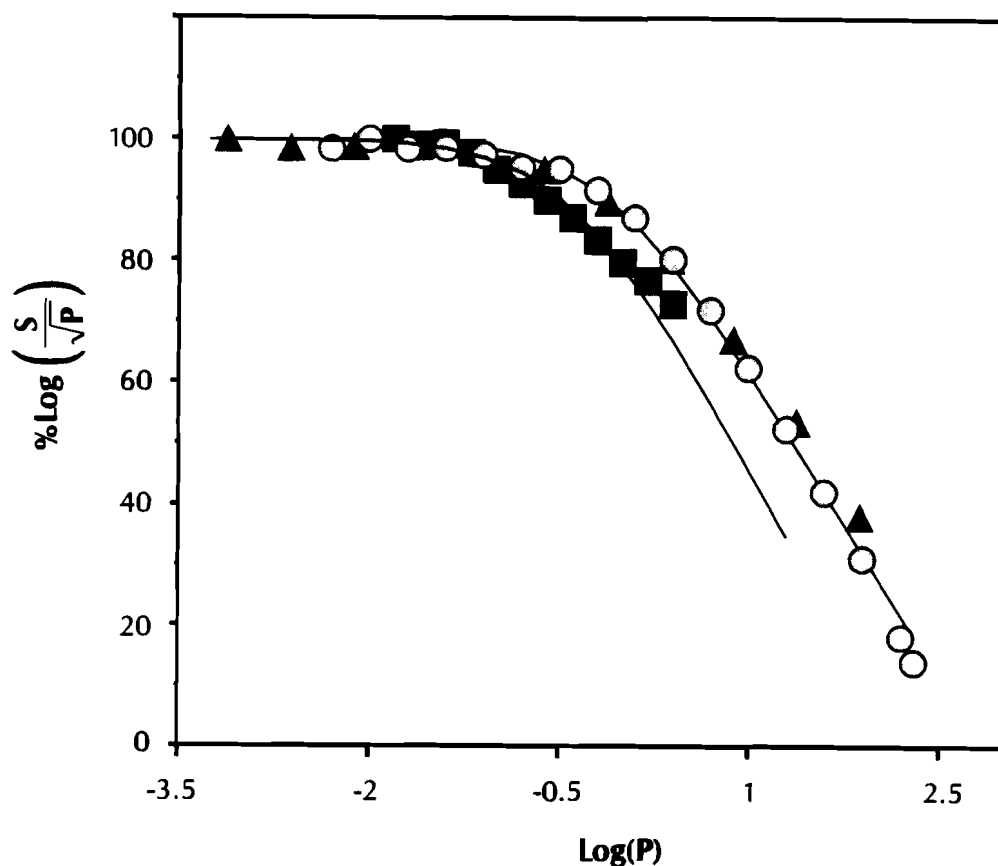


Figura V.12. Variação da intensidade do sinal "g=2.04" do composto modelo em função da potência da micro-onda aplicada. Variação a 8 K (■), 30 K (Δ) e 45 K (○). As linhas representam o ajuste dos pontos experimentais a uma curva teórica, segundo a equação de Beinert, descrita por Rupp e colaboradores (17,18).

A dependência da intensidade do sinal "g=2.04" com a variação da temperatura, à potência de 78.4 μW está representada na Figura V.13. Da análise da curva resultante, verifica-se que a temperatura ótima de detecção deste sinal oscila entre 30 e 55 K. À potência da micro-onda aplicada, o sinal encontra-se saturado a temperaturas inferiores a 30 K; a temperaturas superiores a 60 K começa a observar-se um ligeiro alargamento das linhas, devido ao aumento da velocidade de relaxação.

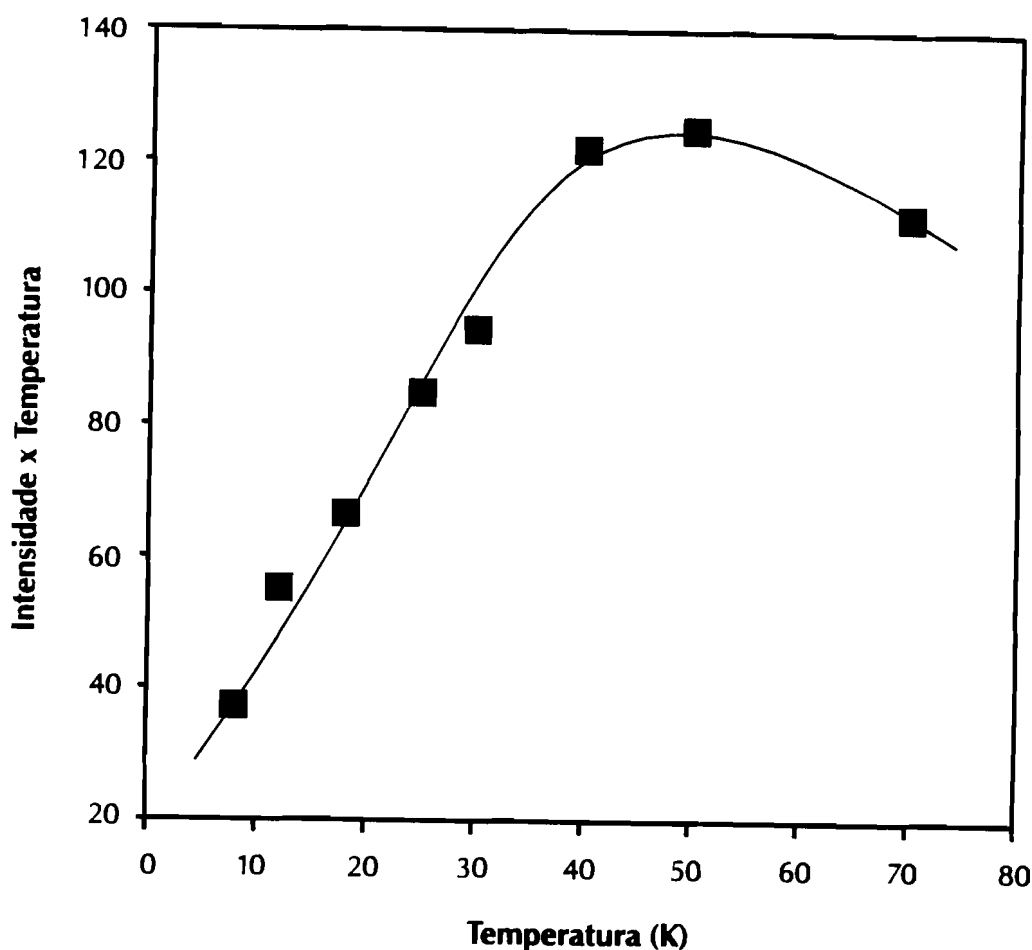


Figura V.13. Variação da intensidade do sinal "g=2.04" do composto modelo com a temperatura, aplicando uma potência da micro-onda de 78.4 μ W.

V.5. Discussão

Do exposto, pode-se dizer que o sinal denominado "g=2.04" observado nos espectros de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* ou das ferredoxinas I e II de *D. gigas*, provém de espécies análogas, na medida em que apresenta propriedades electrónicas e magnéticas (valores de g, larguras de linha e características de saturação com a potência da micro-onda e a temperatura) semelhantes. Por outro lado, o composto inorgânico preparado com Fe(II), cisteína e nitrito/ditionito, parece mimetizar bem a espécie produzida pela incubação das proteínas de ferro-enxofre com NO.

No caso da ferredoxina II foi possível observar uma outra espécie, rômica ($g=2.04, 2.01, 1.97$), que só é detectada pela incubação com baixas concentrações de NO, parecendo ser originada pela interacção do NO com o agregado $[3Fe-4S]^0$. Estudos preliminares da interacção de NO com a hidrogenase de NiFe de *D. desulfuricans* ATCC 27774 ($1 \times [3Fe-4S]$, $2 \times [4Fe-4S]$ e um centro mono-nuclear de Ni), mostram a ocorrência dos dois tipos de sinais induzidos pelo NO. O efeito do NO na ferredoxina II poderia ser interpretado do seguinte modo: a uma concentração mais baixa, o NO interagiria com o agregado $[3Fe-4S]$ originando a espécie rômica; a incubação da mesma amostra com mais NO permitiria a conversão do agregado $[3Fe-4S]$ na forma $[4Fe-4S]$, que na presença de NO produziria a espécie axial, também detectada na redutase do APS e na ferredoxina I.

Estudos de RPE do composto modelo a diferentes temperaturas, mostram que a ligação do NO aos átomos de ferro (II) são do tipo $[Fe(Cis)_2(NO)_2]$, que é caracterizada pela espécie de RPE com valores de g iguais a 2.039 e 2.016. Esta espécie tem sido detectada em várias proteínas de ferro-enxofre, nomeadamente na aconitase e na ferredoxina de *Porphyra umbilicalis*.^{5,7}

Tem sido sugerido que a interacção do NO origina a desagregação dos agregados ferro-enxofre, produzindo a espécie caracterizada pelo sinal axial a " $g=2.04$ ".³ No entanto, dados preliminares revelam que a reacção com o NO é reversível (ou pelo menos parcialmente reversível) na medida em que foi possível obter o sinal nativo da ferredoxina I tratada com NO (com " $g=2.04$ "), após reoxidação e "lavagem" da amostra com tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7.6. Deste modo, a espécie que é produzida pela incubação das proteínas de ferro-enxofre com NO e que origina o sinal " $g=2.04$ " no espectro de RPE, poderá resultar da interacção de dois grupos NO com um dos átomos de ferro do agregado sem, no entanto, implicar a sua destruição.

A reversibilidade desta interacção é extremamente relevante em termos biológicos. Como foi referido na introdução deste capítulo, a molécula de NO tem-se revelado um importante effector em diversos metabolismos presentes nos seres vivos. Assim, o modo

como este efector interactua com as proteínas de ferro-enxofre (como a redutase do APS e as ferredoxinas) pode contribuir para uma melhor compreensão da função e regulação desses metabolismos.

Para uma melhor percepção do tipo de interacção do NO com os agregados ferro-enxofre, será necessário recorrer à espectroscopia de Mössbauer, que permite a visualização de cada átomo de ferro do agregado. De futuro, será feito um estudo no sentido de perceber se a reacção com o NO é, ou não, reversível. Para tal, amostras de ferredoxina serão incubadas com NO que posteriormente será removido da amostra. Em cada passo serão efectuadas quantificações dos sinais de RPE.

*V.6. A interacção do cianeto com a redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774*

V.6.1. O efeito do cianeto no espectro de visível

O efeito do CN⁻ no espectro de visível da redutase do APS foi estudado pela adição de 20 µl de uma solução de KCN (100 mM de KCN em 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), a uma amostra de proteína (2.6 µM) num volume de 1 ml (CN⁻_{livre}/proteína ~ 300). Traçaram-se os espectros de visível ao longo do tempo de reacção, tendo sido registada a absorvância a 389 nm. A Figura V.14 mostra a evolução, com o tempo, dos espectros de visível da redutase do APS após a adição de cianeto de potássio. Na mesma figura mostra-se a representação gráfica da absorvância a 389 nm em função do tempo. Verifica-se que, ao longo do tempo de reacção, ocorre uma diminuição gradual da absorção na região compreendida entre 500 e 300 nm, sendo mais acentuada a 389 nm, região para a qual contribuem os agregados ferro-enxofre da redutase.

Na Figura V.15 mostra-se a dependência da absorvância a 388 nm em função da concentração de cianeto. Verifica-se que existe uma relação quase linear entre a concentração de CN⁻ e a absorvância a 388 nm, região onde contribuem maioritariamente os agregados ferro-enxofre.

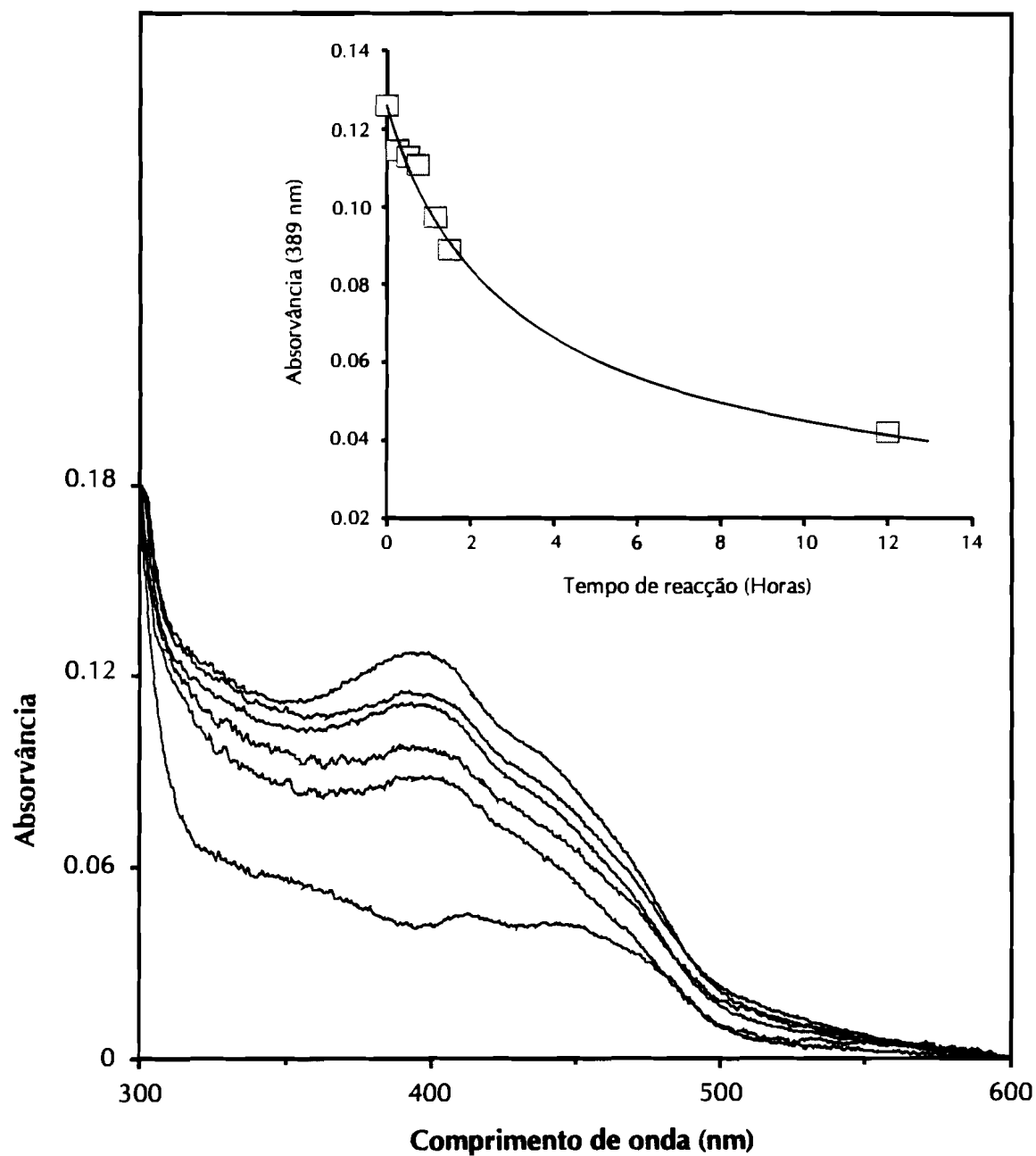


Figura V.14. Efeito do CN^- no espectro de visível da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.

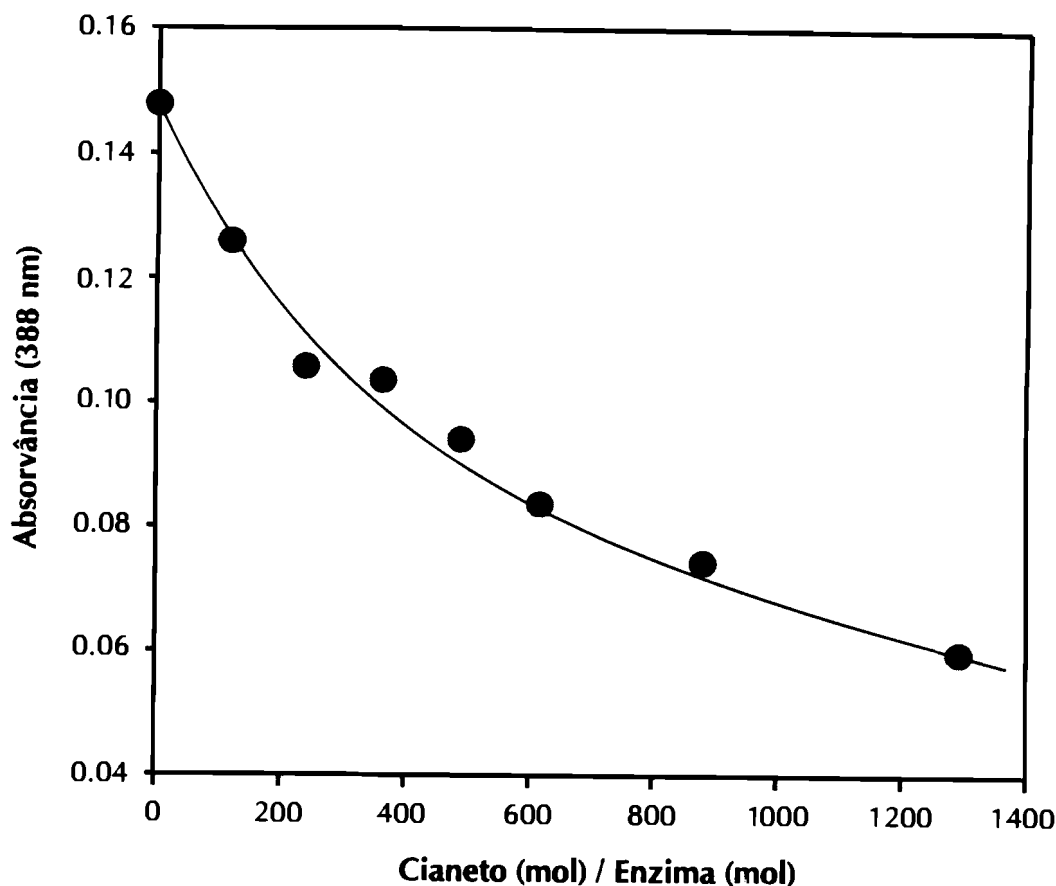


Figura V.15. Variação da absorvância a 388 nm em função da concentração de cianeto.

V.6.2. O efeito do cianeto no espectro de RPE

Como se mostra na Figura V.16, o CN⁻ produz alterações drásticas no espectro de RPE da redutase do APS parcialmente reduzida. A incubação com CN⁻ (CN_{livre}/proteína ~ 300, a pH ~ 8.0) da proteína semi-reduzida com ditionito, modifica drasticamente as propriedades espectroscópicas do centro I (Figura V.16A), resultando na conversão total do sinal típico ($g=2.08$, 1.94 e 1.90 – capítulo IV), num novo sinal caracterizado por valores de g iguais a 2.12, 2.04 e 1.99 (denominado sinal " $g=2.12$ "), tal como se pode observar no espectro B da Figura V.16. A quantificação, por integração dupla, indica que o sinal induzido pelo cianeto representa aproximadamente 1 spin/molécula.

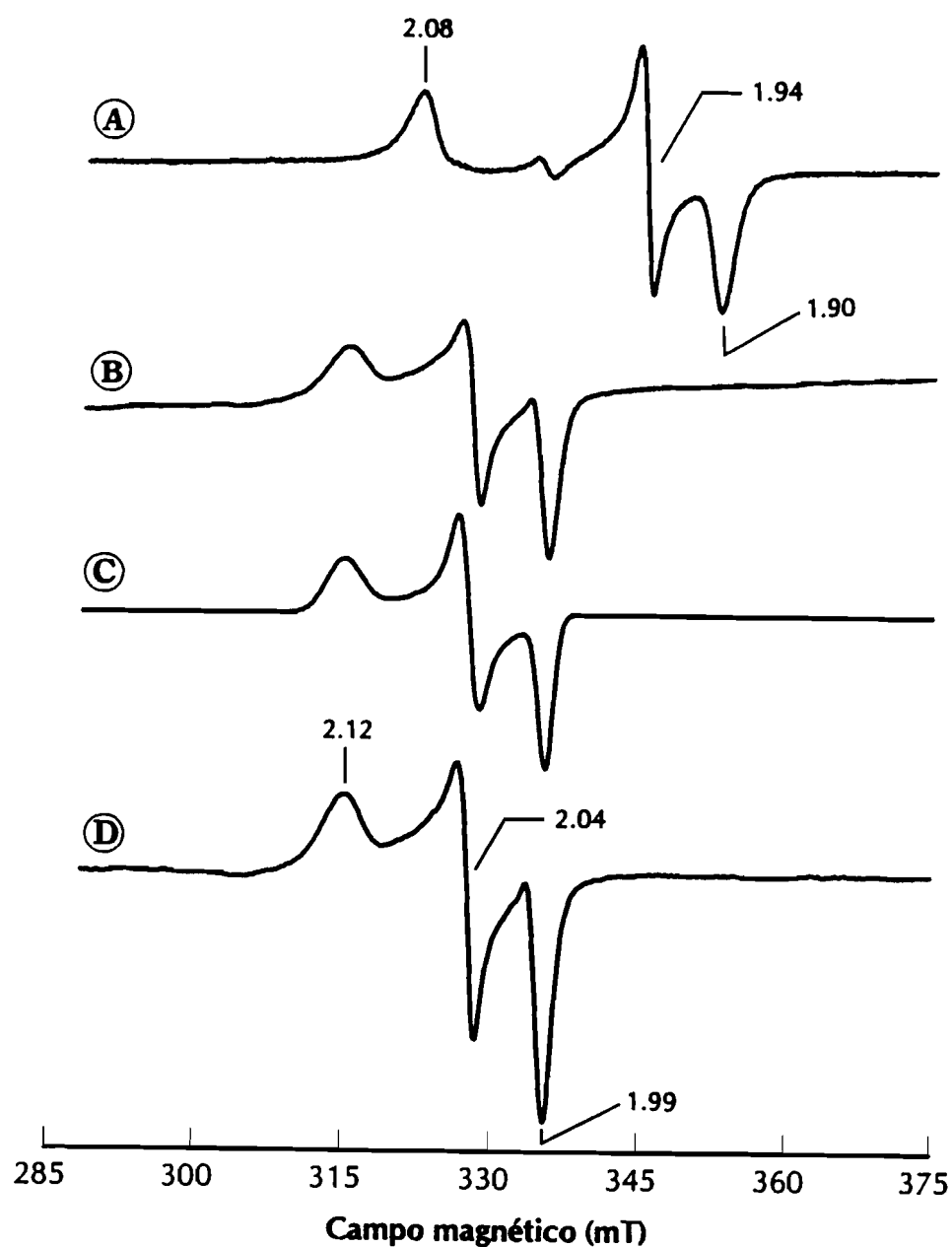


Figura V.16. Efeito do CN^- no espectro de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans*. (A), enzima parcialmente reduzida com ditionito; (B), enzima semi-reduzida e reagida com CN^- ; (C), simulação do espectro anterior; (D), amostra B traçada a 35 K. Condições experimentais: temperatura dos espectros A e B foi de 10 K e do espectro D de 35 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 0.2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 4×10^4 .

Quando se usam amostras de proteína enriquecida isotopicamente com ⁵⁷Fe, observa-se um alargamento das linhas, demonstrando que a espécie induzida pelo CN⁻ provém da interação com átomos de ferro.

A variação da intensidade do sinal associado ao CN⁻ com a temperatura, aplicando-se uma potência da micro-onda de 0.2 mW, é apresentada na Figura V.17. O perfil da curva indica que, para valores de temperatura inferiores a 35 K, as ressonâncias se encontram saturadas; a temperaturas superiores a 60 K, a intensidade decresce devido ao alargamento das linhas. A temperatura óptima de detecção do sinal "g=2.12" varia entre os 35 e os 60 K, obtendo-se uma intensidade máxima entre 35 e 40 K.

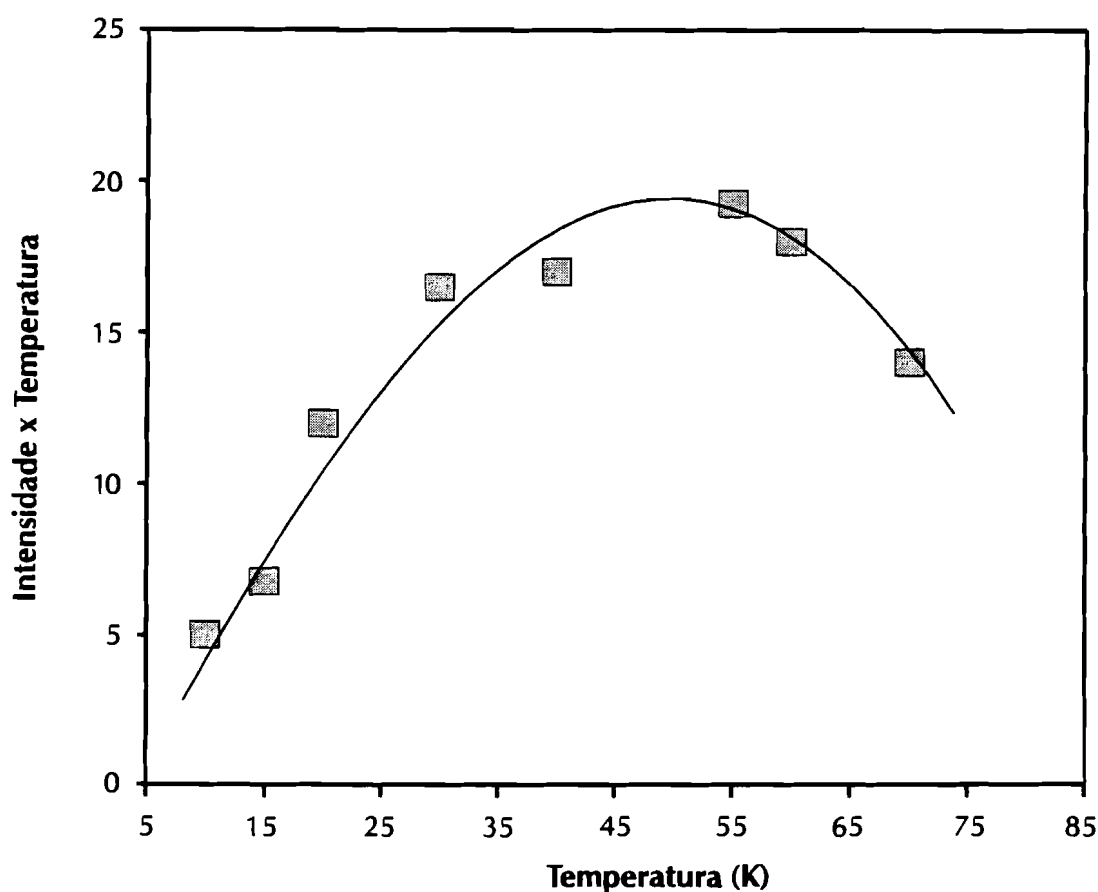


Figura V.17. Dependência da intensidade do sinal de RPE induzido pelo CN⁻, na redutase do APS, com a temperatura, aplicando uma potência de 0.2 mW.

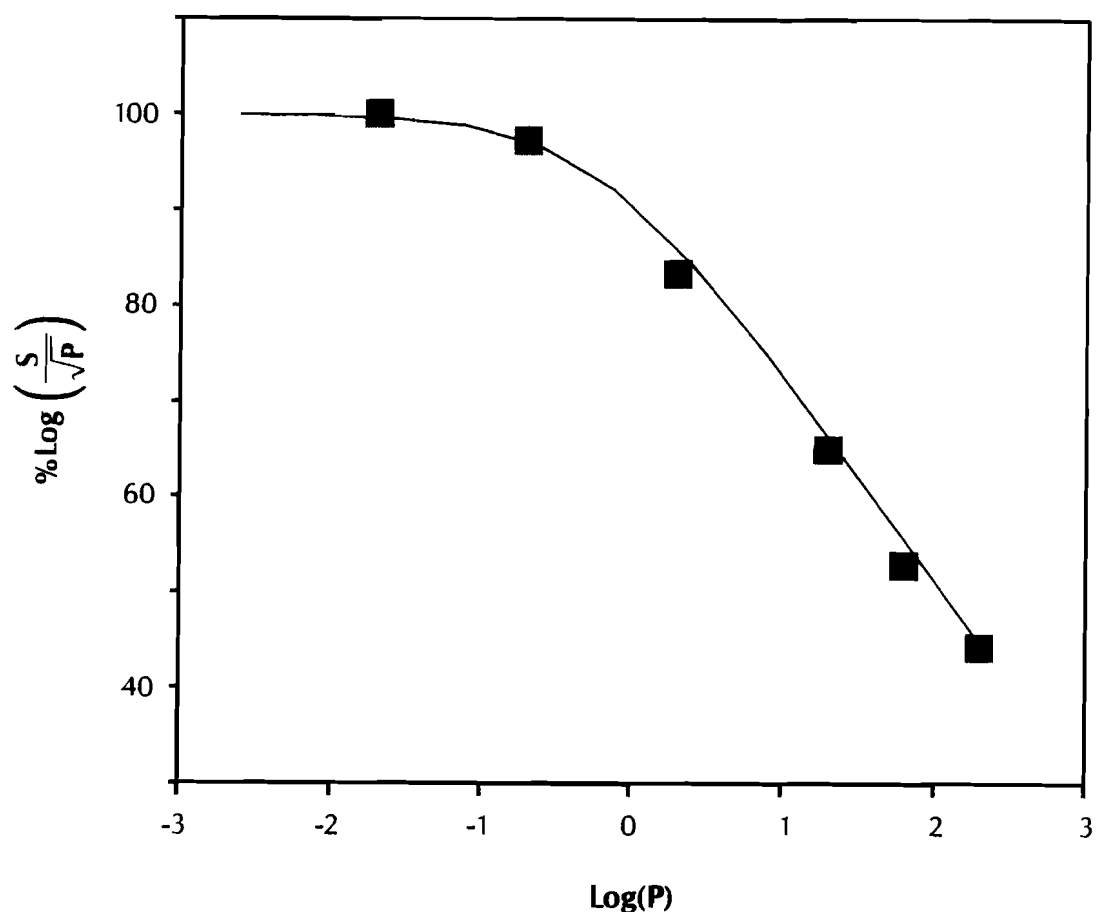


Figura V.18. Dependência da potência do sinal de RPE induzido pelo CN^- , traçada a 35 K. Os pontos experimentais foram ajustados a uma curva teórica.

A dependência da potência do sinal de RPE induzido pelo CN^- , traçada a 35 K, mostra-se na Figura V.18. A curva de saturação mostra que o sinal se encontra saturado a potências aplicadas superiores a 0.2 mW. O ajuste dos pontos experimentais a uma curva de saturação teórica permitiu a determinação dos parâmetros de saturação, tendo sido obtido um valor igual a 1.75 para o parâmetro b e 0.6 mW para $P_{1/2}$.

V.7. Discussão

A adição de cianeto à redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774 produz alterações significativas nos centros activos da redutase, facilmente observados, quer no espectro de visível, quer no espectro de RPE. A diminuição da absorção global do espectro de visível, ao longo da reacção, está associada à interacção do CN⁻ com os agregados ferro-enxofre.

O sinal de RPE induzido pela incubação da redutase do APS com um excesso de CN⁻, apresenta propriedades electrónicas e magnéticas, muito distintas das observadas normalmente nos agregados [4Fe-4S]¹⁺, nomeadamente os valores de *g* (2.12, 2.04 e 1.99). O facto deste sinal atingir uma intensidade máxima à volta dos 35 K também constitui uma característica invulgar, quando comparado com o centro I da redutase do APS, que a esta temperatura não é detectável. De referir, que o sinal obtido é muito diferente do observado pela adição de CN⁻ à ferredoxina de *Pyrococcus furiosus*. Esta proteína (7.5 kDa) contém um agregado [4Fe-4S] em que um dos átomos de ferro se encontra coordenado por grupo OH⁻ pertencente a um resíduo de aspartato. Neste caso, o sinal observado no espectro de RPE pela incubação com CN⁻ apresenta valores de *g* iguais a 2.09, 1.95 e 1.92, sendo visível a temperaturas superiores a 60 K. Os autores sugerem que a molécula de CN⁻ se liga especificamente ao átomo de ferro que se encontra coordenado pelo grupo OH⁻, sem destruição do agregado.

No caso da redutase do APS, o CN⁻ parece ligar-se ao centro I, não afectando o centro II, o que é apoiado pelos seguintes dados: *i*) a espécie induzida representa apenas 0.9 ± 0.2 spins/molécula; se a molécula de cianeto interactuasse também com o centro II, deveria obter-se uma maior concentração em spins e *ii*) o desaparecimento do sinal de RPE do centro I, após a adição de CN⁻ é interpretado em termos da sua total conversão na espécie com o CN⁻ ligado. Tendo em conta a concentração em spins da espécie induzida pelo CN⁻, poderá dizer-se que esta molécula não destrói o agregado ferro-enxofre. A ligação do cianeto ao centro I poderá efectuar-se num átomo de ferro do agregado que ficaria coordenado penta ou octaedricamente, tal como acontece com a ligação do substrato na

aconitase, ou alternativamente por substituição de um dos ligandos cisteínicos.¹⁹ Esta interpretação poderá ser avaliada pela aplicação da espectroscopia de Mössbauer, que permite avaliar o tipo de ligação e o número de coordenação dos átomos de ferro do agregado, após incubação com cianeto.

V.8. Bibliografia

1. Stamler, J.S., Singel, D.J., e Loscalzo, J. 1992. *Science* **258**, 1898-1902.
2. Zumft, W.G. *Arch. Microbiol.* **160**, 253-264.
3. Feldman, P.L., Griffith, O.W., e Stuehr, D.J. 1993. *Chem. Eng. News* **20**, 26-38.
4. Snyder, S.H. 1992. *Science* **257**, 494-496.
5. Drapier, J.-C., Pellat, C., e Henry, Y. *J. Biol. Chem.* **266**, 10162-10167.
6. Drapier, J.-C., Hirling, H., Wietzerbin, J., Kaldy, P., e Kühn, L.C. 1993. *EMBO J.* **12**, 3643
7. Kennedy, M.C., e Beinert, H. 1994. *J. Inorg. Biochem.* **56**, 48.
8. Salerno, J.C., Ohnishi, T., Lim, J., e King, T.E. 1976. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 833-840.
9. Meyer, J. 1981. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 246-256.
10. Michalski, W.P., e Nicholas, D.J.D. 1987. *Arch. Microbiol.* **147**, 304-308.
11. Henry, Y., Drucocq, C., Drapier, J.-C., Servent, D., Pellat, C., e Guisssani. 1991. *Eur. Biophys. J.* **20**, 1-15.
12. McDonald, C.C., Phillips, W.D., e Mower, H.F. 1965. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3319-3326.
13. Woolum, J.C., Tiezzi, E., e Commoner, B. 1968. *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 311-320.
14. Ensign, S.A., Hyman, M.R., e Ludden, P.W. 1989. *Biochem.* **28**, 4973.
15. Seefeldt, L., e Arp, D.J. 1989. *J. Bacteriol.* **171**, 3298-3303.
16. Conover, R.C., Park, J.-B., Adams, M.W.W., e Johnson, M.K. 1991. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2799-2800.
17. Rupp, H., Rao, K.K., Hall, D.O., e Cammack, R. 1978. *Biochim. Biophys. Acta* **537**, 255-269.
18. Rupp, H., e Moore, A.L. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 16-29.

19. Beinert, H., e Kennedy, M.C. 1989. *Eur. J. Biochem.* 186, 5-15.

CAPÍTULO VI

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA REDUTASE DO APS DE *THIOBACILLUS DENITRIFICANS ATCC 23642*

VI. Purificação e caracterização da redutase do APS de Thiobacillus denitrificans ATCC 23642.

1. Introdução	227
2. Crescimento bacteriano e purificação	228
3. Caracterização bioquímica	229
3.1. Determinação da massa molecular e composição das subunidades	229
3.2. Determinação do conteúdo em ferro	229
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	230
4. Caracterização espectroscópica	233
4.1. Espectroscopia de UV/visível	233
4.2. Espectroscopia de RPE	238
5. Discussão	240
6. Bibliografia	242

VI.1. Introdução

Como mencionado anteriormente, a redutase do APS é uma enzima essencial no processo de redução dissimilativa do sulfato, efectuada pelas bactérias redutoras de sulfato. Esta enzima está também presente em algumas espécies de bactérias oxidantes de enxofre pertencentes ao género *Thiobacillus*.

A grande similaridade a nível das propriedades fisico-químicas entre as redutases do APS descritas, sugere que esta enzima é altamente conservada ao longo da linha evolutiva das bactérias (redutoras de sulfato ou oxidantes de compostos de enxofre), embora nada se saiba quanto à possível conservação da sua estrutura. Deste modo, seria interessante estudar e comparar as propriedades fisico-químicas, bem como a composição do sítio activo das redutases do APS isoladas de bactérias oxidantes de compostos de enxofre e de redutores de sulfato, na medida em que os processos metabólicos presentes nestes organismos são bastante diferentes. Por outro lado, foi sugerido que a redutase do APS purificada de *Thiobacillus thioparus* possui um mecanismo reaccional de oxidação do sulfito diferente das restantes redutases. Contrariamente ao observado nas redutases do APS das bactérias redutoras de sulfato, com base em estudos cinéticos de "stopped flow", foi proposto que o mecanismo desta enzima não envolve a formação de aducto entre a flavina contida na proteína e a molécula de sulfito, passando pela produção de uma semi-quinona (ver capítulo III).¹

Neste capítulo, descreve-se a purificação e caracterização espectroscópica da redutase do APS de *Thiobacillus denitrificans* ATCC 23642. Foi feito um esforço no sentido de avaliar a reacção dos substratos com a enzima, com o objectivo de estabelecer um mecanismo reaccional. Usando uma variedade de técnicas bioquímicas e espectroscópicas (espectroscopias de visível e RPE) verificou-se que, em oposição ao observado por Adachi e colaboradores na redutase do APS de *T. thioparus* e tal como nas enzimas isoladas de *D. vulgaris*, *D. gigas* e *D. desulfuricans*, a adição de sulfito à proteína nativa origina a formação de um aducto FAD:sulfito.^{1,2,3}

VI.2. Crescimento bacteriano e purificação

As células de *T. denitrificans* ATCC 23642 foram crescidas em condições anaeróbicas, e o extracto celular foi preparado segundo o método indicado por LeGall e colaboradores.⁴

A purificação da redutase foi efectuada a 4 °C, tendo sido usado tampão Tris-HCl a pH 7.6 em todas as etapas, excepto quando indicado em contrário.

A redutase do APS de *T. denitrificans* foi purificada seguindo um procedimento ligeiramente diferente do descrito no capítulo IV para a redutase de *D. desulfuricans* ATCC 27774. O extracto celular foi aplicado numa coluna de permuta iónica DEAE-52 (6 x 32.5 cm) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. Após lavagem da coluna com o mesmo tampão, foi aplicado um gradiente iónico linear entre 0.01 e 0.3 M com um volume total de 5 litros. A fracção que continha maioritariamente a redutase do APS foi recolhida a uma força iónica aproximada de 0.16 M de tampão Tris-HCl. Esta fracção foi dialisada contra água destilada, durante uma noite, e posteriormente concentrada num Diaflo equipado com um membrana de exclusão molecular YM30. A etapa seguinte foi efectuada numa coluna de Bio-Gel (4 x 30 cm) equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. A eluição das proteínas foi feita aplicando-se um gradiente iónico linear a variar entre 0.01 e 0.2 M, num volume total de 3 litros. A fracção principal de redutase do APS foi eluída a uma força iónica de 0.17 M e apresentava uma coloração amarelo-acastanhada. Procedeu-se à concentração da fracção da redutase num Diaflo com membrana YM30, que foi dialisada por adições sucessivas de água destilada durante o processo de concentração, até se atingir uma força iónica aproximadamente igual a 10 mM. As duas últimas etapas da purificação foram efectuadas num sistema de HPLC. Numa primeira fase usou-se uma coluna de permuta iónica DEAE-5PW, na qual foi injectada cerca de 10 ml da fracção a purificar. Foi usado um gradiente iónico linear de 0.01 a 0.3 M de tampão Tris-HCl, pH 7.0 para a eluição da amostra. A banda que continha a redutase do APS foi eluída a uma força iónica de aproximadamente 0.16 M. O espectro de UV/visível desta fracção apresentava características típicas da redutase do APS e uma razão de pureza, $A_{278}/A_{392} = 6.89$. Na

etapa final foi usada uma coluna de filtração em gel TSK G-3000 SW (21.5 mm x 60 cm), tendo sido recolhida uma fracção pura de redutase do APS com uma razão de pureza $A_{278}/A_{392} = 5.1$. A pureza da proteína foi confirmada por electroforese em gel de poliacrilamida (10%) em condições não desnaturantes (ver Apêndice A).

VI.3. Caracterização bioquímica

VI.3.1. Determinação da massa molecular e composição das subunidades

A massa molecular da redutase do APS foi determinada por cromatografia de exclusão molecular em sistema de HPLC, usando-se uma coluna TSK G-3000 SW. A eluição foi feita com tampão 0.3 M de NaCl em 0.1 M de tampão Tris-HCl, pH 7.0. A massa molecular obtida para a redutase do APS de *T. denitrificans*, por comparação com as massas das proteínas padrão usadas, foi de 185 ± 5 kDa.

A massa molecular das subunidades foi determinada por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5% em acrilamida) na presença de 0.1% de SDS. Tal como nas redutases do APS isoladas de bactérias redutoras de sulfato observam-se duas bandas no gel, com massa molecular aproximada de 77 ± 2 e 25 ± 2 kDa (Figura VI.1). Os resultados obtidos estão de acordo com os observados nas redutases anteriormente descritas.

VI.3.2. Determinação do conteúdo em ferro

O teor em ferro foi determinado pelo método do TPTZ descrito por Fisher e Price.⁵ Usando uma concentração de proteína determinada pelo método de Lowry, obteve-se um valor igual a 7 ± 1 átomos de ferro por molécula de redutase.⁶

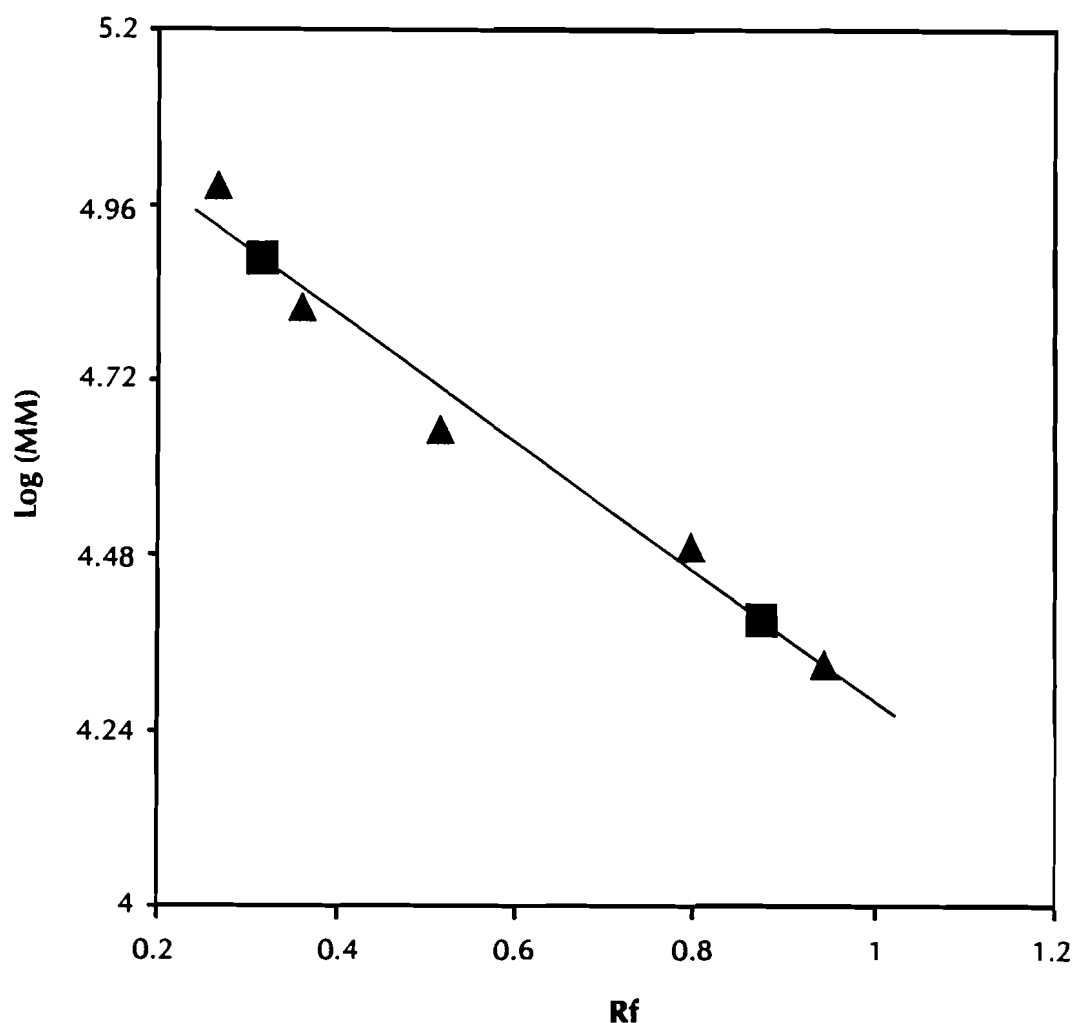


Figura VI.1. Determinação das subunidades da redutase do APS de *T. denitrificans* por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5% em acrilamida) na presença de 0.1% de SDS. Os (▲) representam as proteínas padrão usadas e os (■) representam as subunidades da redutase.

VI.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos relativos aos substratos, AMP e sulfito, foram determinados a pH 7.6, usando ferricianeto de potássio como aceitador de electrões, de acordo com um método adaptado de Bramlett por Lampreia e colaboradores (Apêndice A).^{7,8}

A partir da linearização de Lineweaver-Burk da equação de Michaelis-Menten, obtiveram-se valores de K_m para o sulfito e AMP, iguais a 1.4 e 0.31 mM, respectivamente. As curvas resultantes da representação da velocidade de redução do ferricianeto em função da concentração de cada substrato são apresentadas na Figura VI.2 e VI.3. Estes valores são consistentes com os observados em outras redutase do APS isoladas de diferentes organismos.⁹

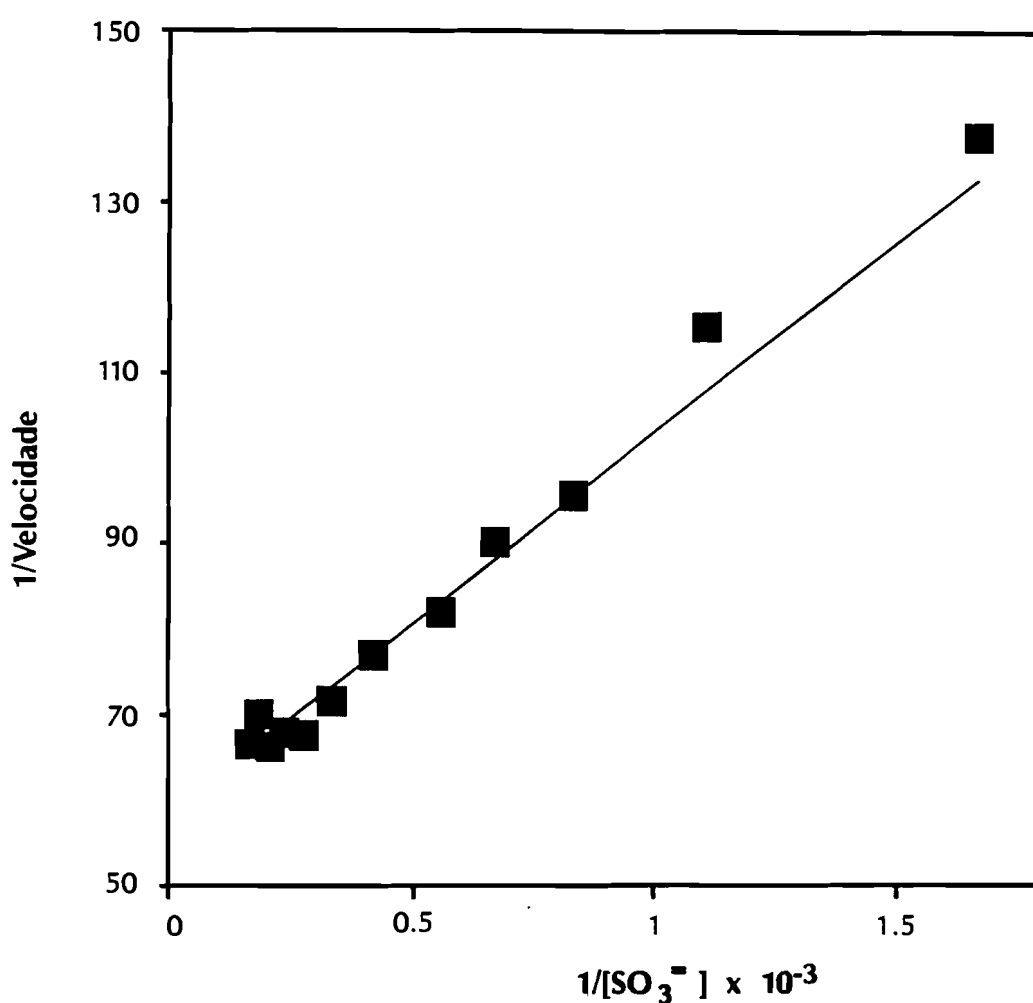


Figura VI.2. Determinação do valor de K_m para o sulfito da redutase do APS de *T. denitrificans*, através da linearização de Lineweaver-Burk. O K_m para o sulfito igual a 1.4 mM.

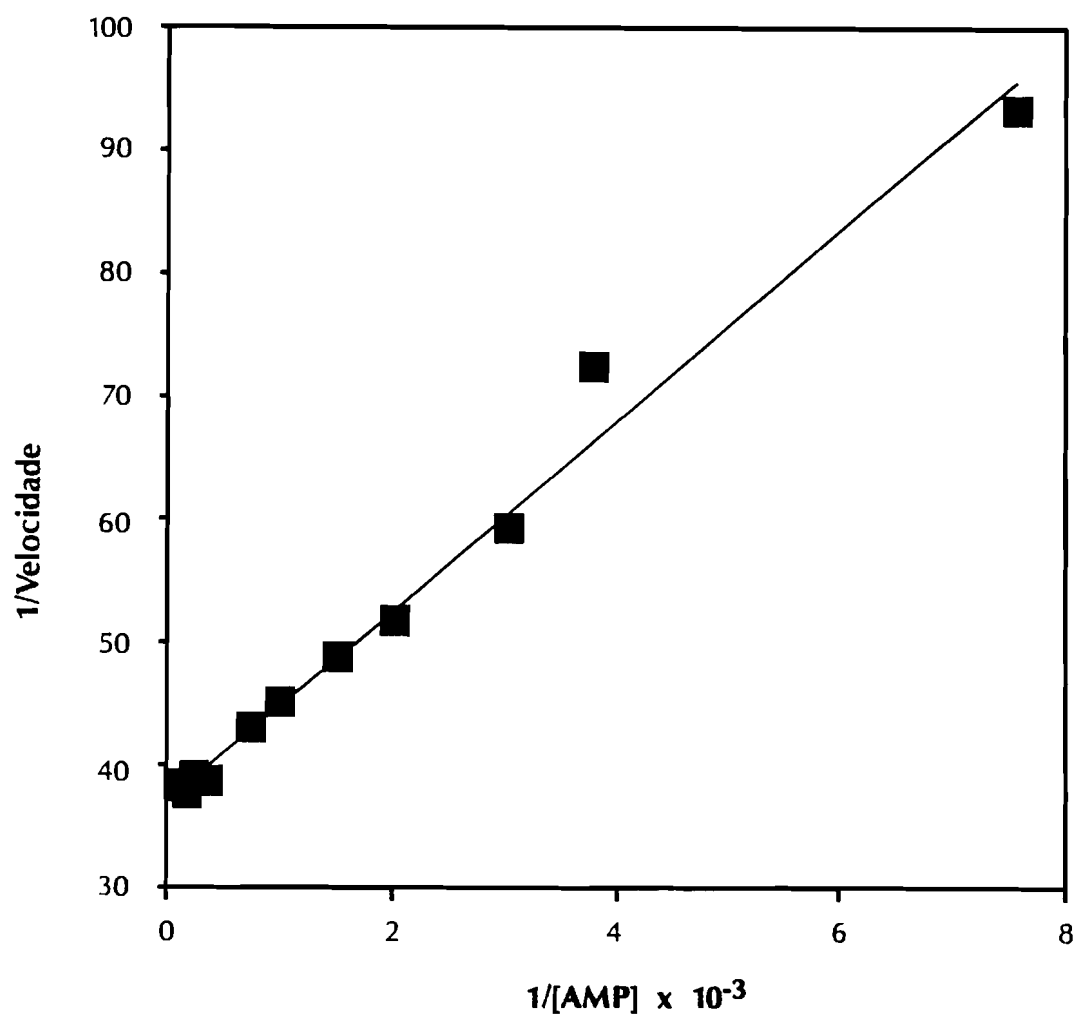


Figura VI.3. Determinação do valor de K_m para o AMP da redutase do APS de *T. denitrificans*, através da linearização de Lineweaver-Burk. O K_m para o AMP igual a 0.31 mM.

A actividade máxima da enzima, determinada em função do pH (ver apêndice A), é atingida a pH igual a 7.4, usando-se concentrações constantes de sulfito e AMP iguais a 3.0 e 3.3 mM, respectivamente (Figura VI.4).

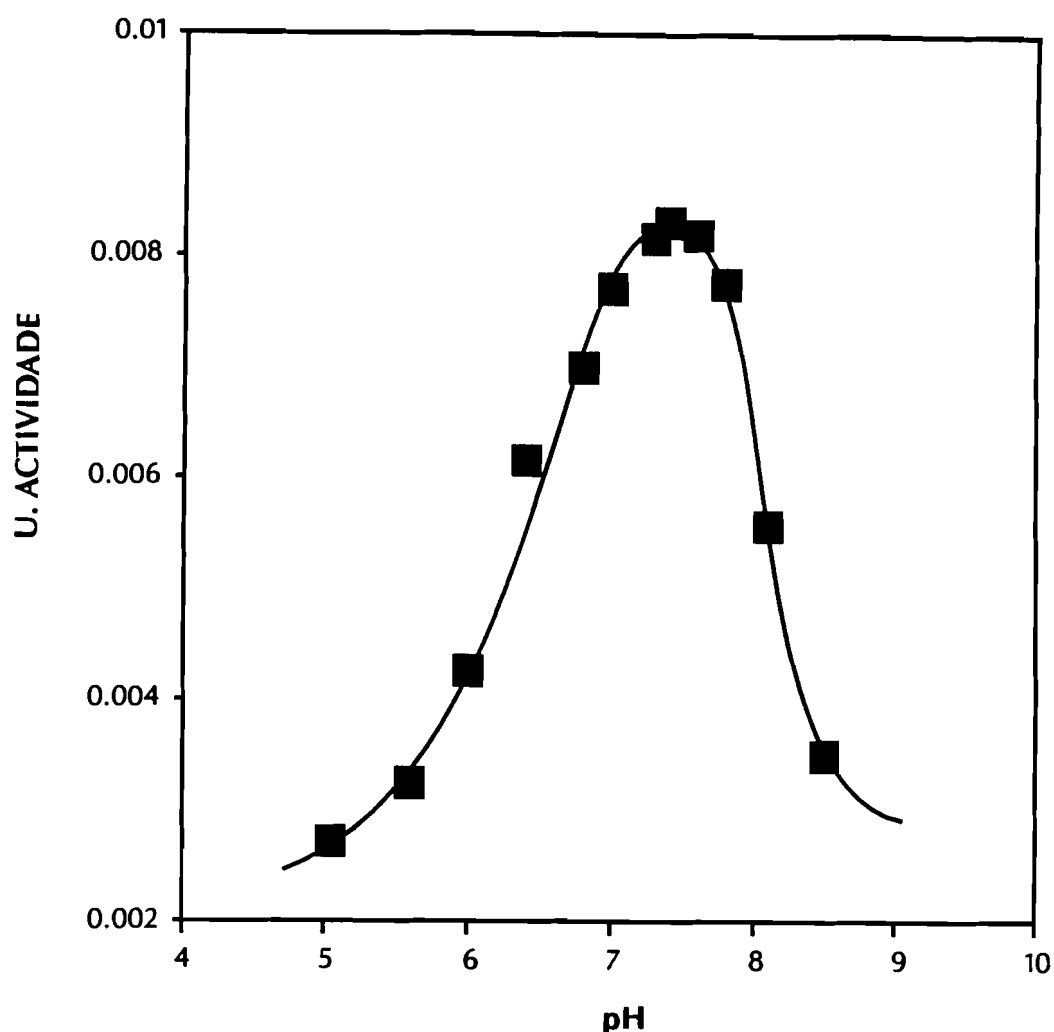


Figura VI.4. Variação da actividade da redutase do APS de *T. denitrificans* em função do pH (tampão Tris-maleato, 0.2 M). O pH_{óptimo} determinado na presença de 3.0 mM de sulfito e 3.3 mM de AMP é igual a 7.4.

VI.4. Caracterização espectroscópica

VI.4.1. Espectroscopia de UV/visível

O espectro de UV/visível da redutase do APS de *Thiobacillus denitrificans* no estado nativo é caracterizado por uma banda muito larga com máximo de absorção a 392 nm. São ainda observados ombros largos entre 475 e 445 nm e um pico de absorção máxima a 278 nm (Figura VI.5). Tal como na maioria das redutases do APS, o espectro de visível evidencia a presença de centros ferro-enxofre e de grupos flavínicos.^{1,9}

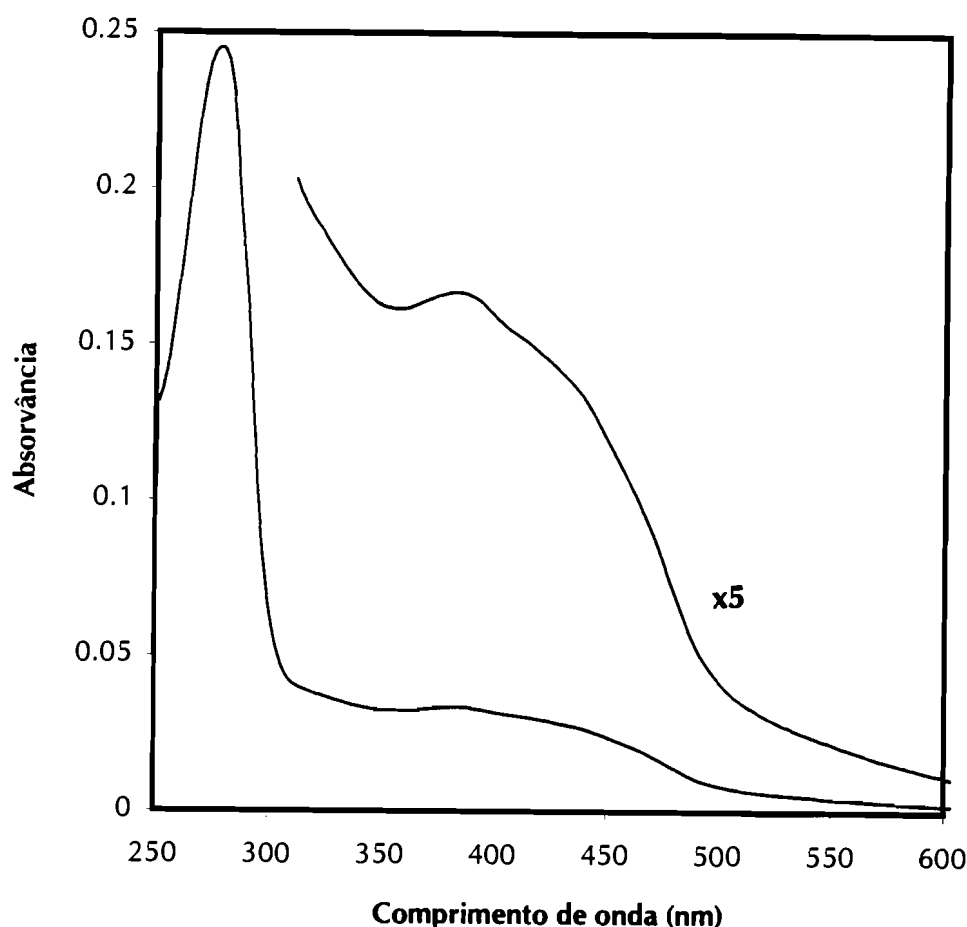


Figura VI.5. Espectro de UV/visível da redutase do APS isolada de *Thiobacillus denitrificans*.

De um modo geral, o espectro de visível da redutase do APS de *T. denitrificans* é muito semelhante ao da proteína homóloga anteriormente isolada de *T. thioparus*.¹⁰

O coeficiente de extinção molar da redutase do APS de *T. denitrificans* foi calculado com base na concentração de proteína determinada pelo método de Lowry. O seu valor, medido a 392 nm, é aproximadamente igual a $49500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este valor é semelhante ao obtido na redutase de *D. gigas* ($50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e é consistente com o conteúdo em ferro e flavina.³

O efeito da adição dos substratos é extremamente importante para avaliar se ocorre, ou não, a formação de aducto entre o grupo FAD e o sulfito. Como foi referido no

capítulo III, a interacção entre a flavina e o sulfito é caracterizada por um aumento da absorção a 320 nm após a adição de sulfito à enzima nativa.^{11,12}

Assim, a adição sequencial de sulfito e AMP foi seguida por espectroscopia de UV/visível, nomeadamente pelo traçado de espectros de diferença da enzima tratada de diferentes modos (Figuras VI.6 e VI.7).

Após a adição de sulfito à redutase do APS de *T. denitrificans* é observada uma diminuição da absorvância entre 500 e 340 nm e um ligeiro aumento à volta de 320 nm (Figura VI.6B). Este aumento está associado à formação de um aducto pela interacção do sulfito com a flavina contida na proteína, tal como anteriormente observado nas redutases do APS isoladas de bactérias redutoras de sulfato e contrariamente ao descrito para a redutase de *Thiobacillus thioparus*.^{1,3,9}

A adição posterior de AMP à enzima previamente reagida com sulfito, origina um segundo decréscimo da absorção global do espectro de visível (Figura VI.6C). A reacção da enzima nativa com AMP não afecta o espectro de visível. Verificou-se também que a ordem de adição dos substratos é aleatória. A redução da redutase com ditionito de sódio resulta na diminuição total da absorção do espectro de visível, devida à redução dos cromóforos (Figura VI.6D).

A fim de se proceder à caracterização dos cromóforos e determinar qual o efeito da reacção do AMP e do sulfito com a redutase do APS, foram traçados os espectros de diferença entre a redutase nativa e a enzima reagida com os diferentes substratos (Figura VI.7). Deste modo, a diferença entre o espectro de visível da proteína nativa e o espectro da enzima incubada com sulfito, mostra um perfil semelhante ao de uma flavina no estado reduzido, com bandas de absorção máxima a 393 e ~450 nm (Figura VI.7A).¹¹ Este resultado demonstra que a redutase do APS de *T. denitrificans* possui, no mínimo, uma unidade flavínica e que a adição de sulfito induz a sua redução.

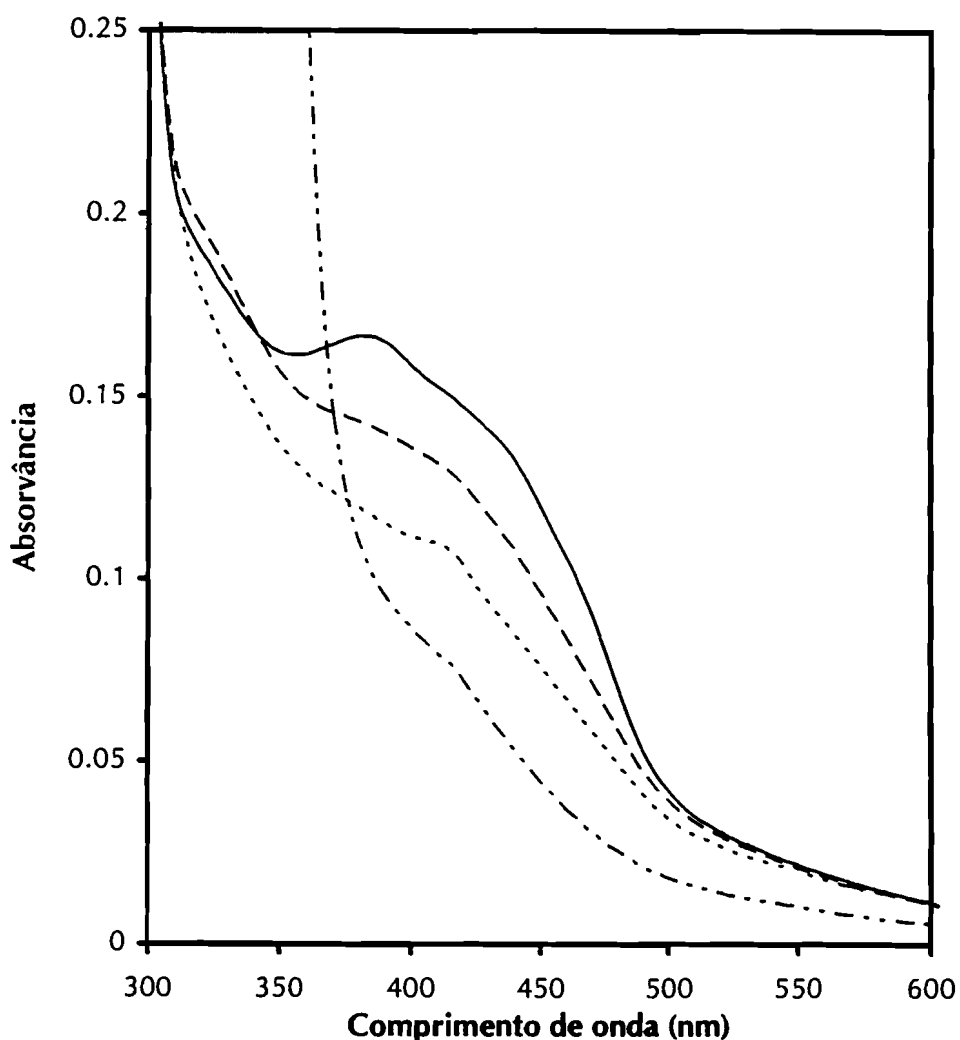


Figura VI.6. Efeito da adição dos substratos no espectro de visível da redutase do APS de *T. denitrificans*. Enzima nativa (—); enzima reagida com sulfito (---); reacção com sulfito e AMP (- - -) e redução da enzima com ditionito de sódio (- . -).

O espectro de diferença entre a enzima nativa e a enzima reagida com AMP e sulfito difere ligeiramente do anterior (Figura VI.7B). O espectro de diferença exibe bandas largas de absorção máxima a 390-370 nm e 450-420 nm, que estão associadas à redução dos agregados de ferro-enzofre.

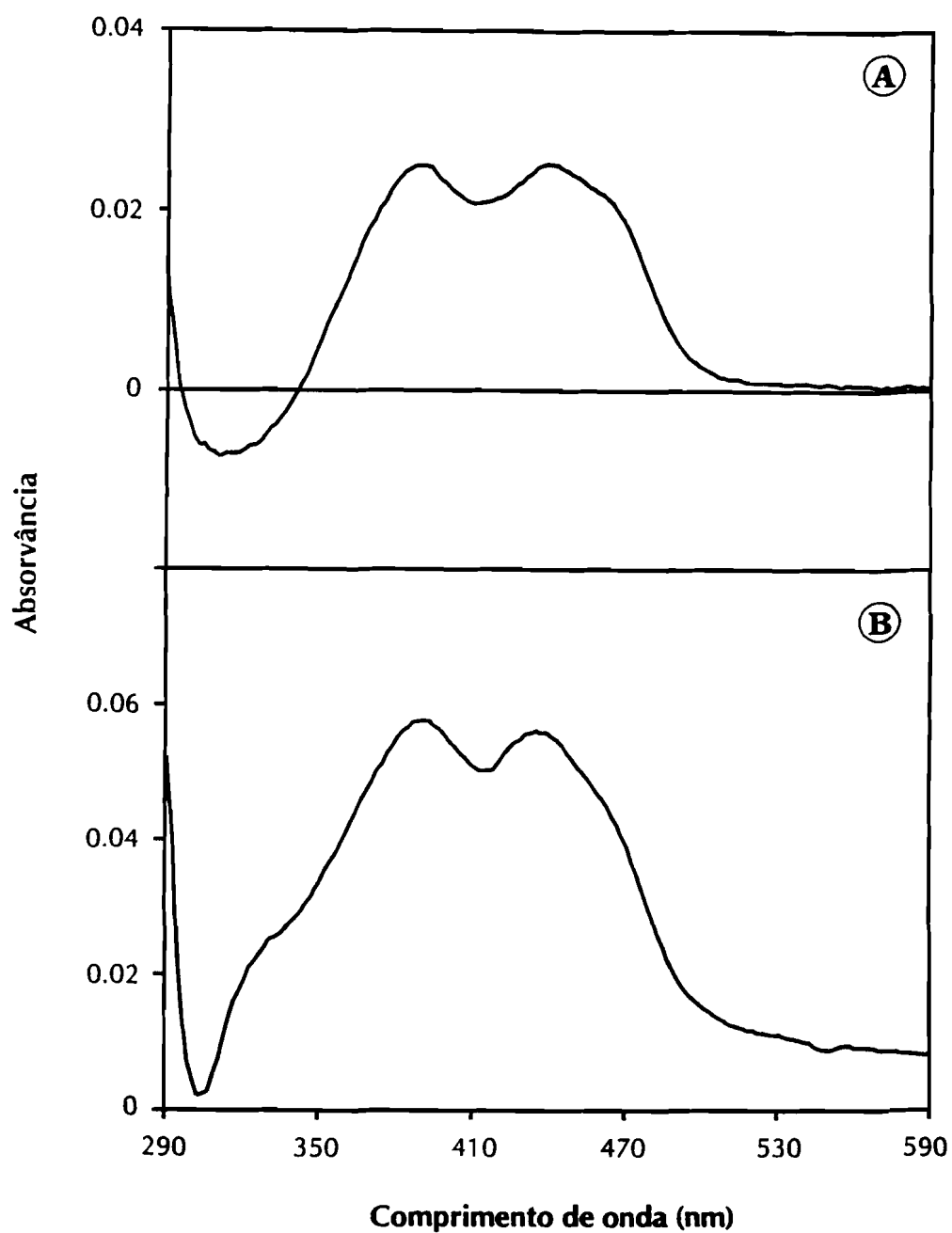


Figura VI.7. Espectros diferença entre a redutase do APS de *T. denitrificans* nativa e a enzima reagida com sulfito e AMP. (A) espectro de visível da enzima nativa menos o espectro da enzima reagida com sulfito e (B) espectro da enzima nativa menos o espectro da enzima reagida com sulfito e AMP.

VI.4.2. Espectroscopia de RPE

De um modo geral, os resultados obtidos pela aplicação da espectroscopia de RPE à redutase do APS de *Thiobacillus denitrificans* ATCC 23642 são semelhantes aos observados nas redutases isoladas de diferentes bactérias do género *Desulfovibrio*, nomeadamente, de *D. desulfuricans* e de *D. gigas* (ver Figura VI.8).^{3,13} Os sinais detectados estão associados aos agregados ferro-enzofre, nunca tendo sido observado qualquer radical correspondente à absorção da flavina no estado semi-reduzido.

O espectro de RPE da redutase do APS de *T. denitrificans* no estado oxidado apresenta o sinal centrado a $g=2.025$, comum a todas as redutases caracterizadas até à data e atribuído a um agregado $[3Fe-4S]$ na forma oxidada.¹⁴ A integração deste sinal, com forma quase isotrópica, indica um valor inferior a 0.2 spin por molécula (Figura VI.8A).

A reacção da enzima com sulfito causa alterações pouco significativas no espectro de RPE da proteína nativa. Observa-se o aparecimento de um sinal rômico, de baixa intensidade, com valores de g iguais a 2.098, 1.944 e 1.895, característico de agregados do tipo $[4Fe-4S]$ no estado reduzido (Figura VI.8B). A adição sequencial de AMP à amostra previamente reagida com sulfito origina um aumento significativo da intensidade do sinal rômico anteriormante referido e a diminuição simultânea da intensidade do sinal isotrópico observado na amostra nativa (Figura VI.8C). Este sinal, denominado centro I, contabiliza 0.33 spins por molécula e é devido à absorção de um agregado $[4Fe-4S]$ no estado reduzido.³ Estas observações poderão indicar que a molécula de AMP favorece a redução do centro I, na presença de sulfito, na medida em que o sinal detectado quando da adição de sulfito é provavelmente devido à presença de uma pequena quantidade de AMP endógeno na amostra.

A redução química rápida ($t < 1$ minuto) da redutase do APS de *T. denitrificans* com ditonito de sódio (100 mM ditonito de sódio em tampão Tris-HCl, pH ~ 9.5), induz o desenvolvimento total do centro I (Figura VI.8D) e o desaparecimento total do sinal isotrópico a $g=2.025$. Os valores de g deste sinal diferem ligeiramente dos do sinal do centro I obtido pela adição de sulfito e AMP, sendo iguais a 2.086, 1.944 e 1.897.

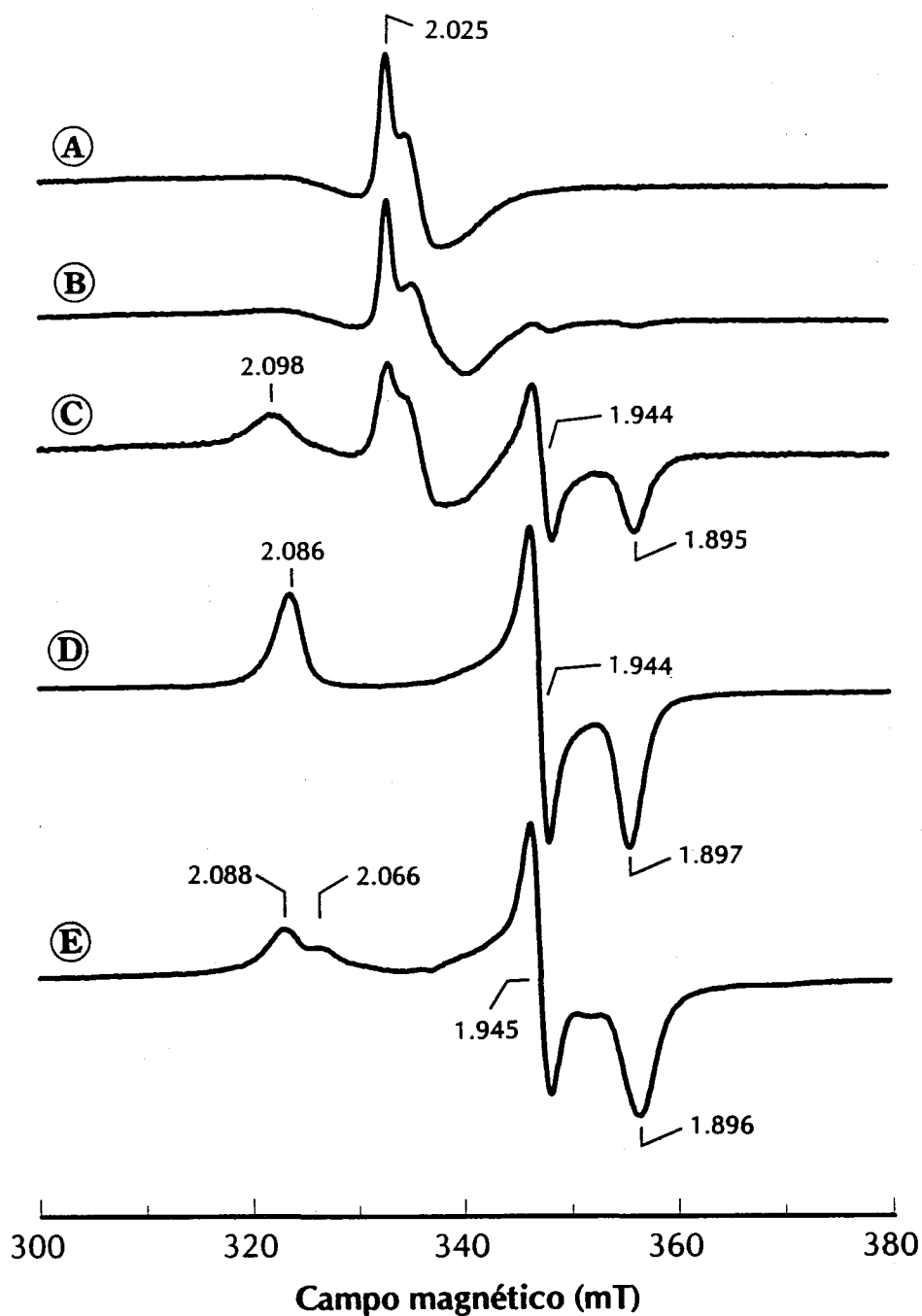


Figura VI.8. Espectros de RPE da redutase do APS de *T. denitrificans* em diferentes estados de oxidação do ciclo catalítico. (A), enzima na forma nativa; (B), enzima reagida com sulfito; (C), enzima reagida com sulfito e AMP; (D), enzima semi-reduzida com dititionito; (E), enzima totalmente reduzida. Condições experimentais: temperatura, 8 K; frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.25×10^4 e para o espectro E, 8×10^3 .

As alterações observadas no centro I quando da adição dos substratos, sugere que este centro está, provavelmente, envolvido no mecanismo catalítico da enzima. Por comparação com o observado, por espectroscopia de Mössbauer, na enzima isolada de *D. gigas*, poderá inferir-se que a interacção do AMP com o centro I provoca uma alteração estrutural do agregado, que depois se reflecte nas suas propriedades magnéticas (valores de g diferentes e alargamento da largura da linha do sinal de RPE). O espectro de Mössbauer da enzima referida indica, por outro lado, que neste estado a amostra se encontra 50 % reduzida.³ O espectro de RPE relativo ao centro I da redutase do APS de *T. denitrificans* contribui com aproximadamente 1 spin por molécula. O desaparecimento do sinal isotrópico (" $g=2.025$ ") deve-se à redução do agregado $[3Fe-4S]$, que em amostras não muito concentradas é difícil de detectar em RPE (ver capítulo II).

O estado totalmente reduzido da redutase do APS de *T. denitrificans* é obtido por incubação com ditionito de sódio durante cerca de 30 minutos. O espectro de RPE da redutase totalmente reduzida, apresenta características típicas de interacção magnética entre agregados de ferro-enxofre, revelando a existência de pelo menos um outro agregado, que foi denominado centro II (Figura VI.8E).¹⁵ Verificou-se, por integração dupla, que o sinal de interacção, representa 1.45 spins por molécula. A dependência de temperatura deste sinal mostra que, a temperaturas superiores a 20 K, algumas componentes desaparecem obtendo-se um espectro de RPE relativo ao centro I.

VI.5. Discussão

Neste capítulo descreve-se, pela primeira vez, a caracterização por RPE de uma redutase do APS isolada de um organismo do género *Thiobacillus*. Os dados espectroscópicos revelam uma elevada homologia com as redutases isoladas de bactérias do género *Desulfovibrio* ou da arqueobactéria *A. fulgidus*.^{9,13}

Por analogia com as restantes redutases do APS propõe-se que a redutase do APS de *Thiobacillus denitrificans* ATCC 23642 contém dois agregados de ferro-enxofre distintos, do tipo [4Fe-4S] e um grupo FAD.

As propriedades gerais da redutase do APS de *T. denitrificans*, comparadas com as das restantes redutases, sugerem que as vias de redução dissimilativa do sulfato e de oxidação de compostos de enxofre, nos diferentes microrganismos, envolvem uma redutase do APS com características fisiológicas e catalíticas idênticas.

Do ponto de vista espectroscópico, é importante dar ênfase ao facto de ter sido detectada a formação de aducto entre a flavina e o sulfito, contrariamente ao observado por Adachi e Suzuki na redutase de *T. thioparus*.¹ Os autores propuseram a não ocorrência de aducto e mostraram a formação de uma semi-quinona aniónica durante o processo de oxidação do sulfito.

Pensa-se também que o mecanismo global de catálise seja idêntico ao das redutases isoladas de bactérias redutoras de sulfato, envolvendo a formação de aducto entre a unidade flavínica da enzima e a molécula de sulfato. No entanto, o mecanismo (ou mecanismos) reaccional das redutases do APS isoladas de organismos redutores de sulfato ou de bactérias do género *Thiobacillus*, continua a ser uma questão de controvérsia. Para um melhor esclarecimento dos mecanismos catalíticos deveria ser realizado um estudo espectroscópico detalhado, nomeadamente pela aplicação da espectroscopia de Mössbauer. O uso de técnicas de cinética rápida ("stopped flow") nas redutases do APS, isoladas dos diferentes organismos, seria útil para a detecção da possível formação de uma semi-quinona, na medida em que por técnicas normais de RPE nunca foi possível detectar qualquer radical. Mais, a caracterização espectroscópica de uma redutase do APS de um organismo fototrófico seria importante na avaliação filogenética destes microrganismos, com base nas propriedades biofísicas desta enzima.

VI.6. Bibliografia

1. Adachi, K., e Suzuki, I. 1977. *Can. J. Biochem.* 55, 91-98.
2. Michaels, G.B., Davidson, J.T., e Peck, H.D., Jr. 1970. *Biochim. Biophys. Acta* 39, 321-328.
3. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1990. *Eur. J. Biochem.* 188, 653-664.
4. LeGall, J., Mazza, G. e Dragoni, N. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 99, 385-387.
5. Fisher, D.S., e Price, D.C. 1964. *Clin. Chem.* 10, 21-31.
6. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.L. e Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
7. Lampreia, J. 1989. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
8. Bramlett, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* 250, 2979-2986.
9. Lampreia, J., Moura, I., Xavier, A.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., e Moura, J.J.G. 1990. In "Chemistry and biochemistry of flavoenzymes", Ed. F.Müller, Vol. III págs. 333-355.
10. Peck, H.D., Jr., Deacon, T.E., e Davidson, J.T. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 96, 429-446.
11. Massey, V., Müller, F., Feldberg, R., Schuman, M., Sullivan, P.A., Howell, L.G., Maythew, S.G., Mathews, R.G., e Foust, G.P. 1969. *J. Biol. Chem.* 244, 3999-4006.
12. Müller, F., e Massey, V. 1969. *J. Biol. Chem.* 244, 4007-4016.
13. Lampreia, J., Fauque, G., Speich, N., Dahl, C., Moura, I., Trüper, H.G., e Moura, J.J.G. 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 342-347.
14. Lampreia, J., Pereira, A.S., e Moura J.J.G. 1994. *Methods in Enzymology* 243, em impressão.
15. Cammack, R., Dickinson, D.P.E., e Johnson, C.E. 1977. In "Iron-sulfur proteins", Ed. W. Lovenberg, Vol. III, págs. 283-330, Academic Press, New York.

CAPÍTULO VII

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO
METABOLISMO DO ENXOFRE NUM REDUTOR DE SULFATO ACTIVO EM
BIOCORROSÃO: *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* SUBESPÉCIE
DESULFURICANS NEW JERSEY. CARACTERIZAÇÃO TAXONÓMICA**

VII. Identificação, purificação e caracterização preliminar de proteínas de D. desulfuricans NJ.

1. Introdução	245
2. Crescimento bacteriano e preparação do extracto celular	246
3. Identificação e purificação da redutase do APS	248
3.1 Purificação da redutase do APS	249
3.2. Purificação de proteínas úteis para a classificação taxonómica da espécie em estudo	249
3.2.1. Desulforubidina	249
3.2.2. Citocromo c_3 (periplasmático)	252
3.2.3. Hidrogenase membranar	252
4. Caracterização das proteínas purificadas de <i>D. desulfuricans</i> NJ	253
4.1. Caracterização da redutase do APS	253
4.2. Caracterização da desulforubidina	258
4.3. Caracterização do citocromo c_3 periplasmático	262
5. Discussão	267
6. Bibliografia	270

VII.1. Introdução

Como anteriormente já referido, as bactérias redutoras de sulfato constituem um grupo taxonomicamente variado, mas fisiologica e ecologicamente bastante homogéneo. Estão largamente distribuídas por toda a biosfera, em ambientes anaeróbicos nomeadamente em meios terrestres e aquáticos. Como consequência da anaerobiose obrigatória e das restrições termodinâmicas impostas pelo seu metabolismo, as bactérias redutoras de sulfato existem na natureza como componentes de consórcios de organismos. Estes consórcios originam normalmente a formação de biofilmes, permitindo a constituição de microambientes anaeróbicos, na presença de oxigénio.

As bactérias redutoras de sulfato têm a capacidade de reduzir a molécula de sulfato até ao nível do sulfureto, utilizando uma série de enzimas e proteínas de transporte electrónico. Estas proteínas têm sido extensivamente estudadas, quer do ponto de vista bioquímico, quer do ponto de vista espectroscópico. No entanto, o conhecimento actual sobre a função e os dadores de electrões destas proteínas é menos aprofundado, principalmente pelo facto de nem sempre existirem as proteínas homólogas nas várias espécies bacterianas pertencentes ao mesmo género.

A actividade das bactérias redutoras de sulfato, tem sido associada à corrosão de metais em ambientes anaeróbicos, tendo um forte impacto ambiental e económico. A produção de sulfureto, em larga escala, tem como consequência a degradação e corrosão de monumentos, máquinas industriais, condutas de petróleo e óleos constituídas por ligas metálicas. A acção das bactérias redutoras de sulfato neste processo de biocorrosão parece fazer-se a nível da solubilização de metais, nomeadamente de ferro, através de uma reacção electroquímica (despolarização catódica), e subsequente formação de depósitos de materiais insolúveis que originam gradientes de oxigenação ao longo do biofilme (ver capítulo I).^{1,2}

A percepção dos mecanismos envolvidos na corrosão, bem como o seu controle, devida à acção das bactérias redutoras de sulfato com o objectivo de desenvolver medidas preventivas é extremamente importante do ponto de vista industrial.

As enzimas envolvidas nos processos de biocorrosão, nomeadamente a hidrogenase, a redutase do APS e a redutase do sulfito, têm sido alvo de um extensivo estudo estrutural e cinético. Sabe-se que a actividade de qualquer uma destas enzimas é inibida na presença de vários inibidores da corrosão microbiana (como por exemplo o metronidazole ou *k*-DMDT).^{3,4} No entanto o seu papel concreto neste processos ainda não é conhecido.

Diversas espécies bacterianas foram já isoladas e classificadas em grupos, com base nas suas características morfológicas, nutricionais e bioquímicas.

Neste capítulo, descrever-se-á a identificação, purificação e caracterização preliminar de várias proteínas da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* New Jersey NCIMB 8313. Esta bactéria foi isolada do interior de tubagens de ferro de permutadores de calor, sob corrosão microbiana activa, nos anos 40 (cedida pela Dr. I. Beech, Universidade de Portsmouth, Reino Unido). Por comparação das propriedades fisico-químicas das proteínas isoladas, é proposta uma reclassificação da espécie, dada a similaridade existente com as proteínas isoladas da bactéria *Desulfomicrobium baculatus* (anteriormente classificada como *Desulfovibrio baculatus*).

Este estudo faz parte de um projecto de colaboração com a Prof. A. R. Lino e Prof. A. Reis.

VII.2. Crescimento bacteriano e preparação do extracto celular

As células de *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* New Jersey NCIMB 8313 (por questão de conveniência será referida como *Desulfovibrio* (*D.*) *desulfuricans* (*d.*) NJ) foram crescidas anaerobicamente, a 37 °C, na presença de lactato e sulfato, segundo o método descrito por LeGall e colaboradores (Apêndice A).⁵ Uma análise preliminar do conteúdo em hidrogenase revelou valores de actividade específica muito semelhantes aos obtidos no caso da bactéria *Desulfomicrobium* (*Dsm.*) *baculatus*, na qual se observou a presença de hidrogenase do tipo NiFeSe (R. Franco, Tese de Doutoramento em

preparação).⁶ Com o objectivo de se obter um melhor rendimento em hidrogenase, preparou-se um segundo extracto celular, enriquecido em selénio, usando-se um procedimento semelhante ao descrito por He e colaboradores.⁷ Ao meio de cultura de lactato/sulfato referido anteriormente foram adicionados 1 mg/l de selenito de sódio. As células crescidas no meio enriquecido foram recolhidas (~20 g), após cerca de 15 horas, no fim da fase logarítmica/início da fase estacionária da curva de crescimento.

As células crescidas em meio normal lactato/sulfato (~72 g) foram recolhidas por centrifugação a 4500 x g, durante 15 minutos. As células foram ressuspensas cuidadosamente em tampão Tris-HCl a pH 7.6 (10 mM), num volume final de 550 ml. O sobrenadante foi decantado, constituindo o extracto celular da fracção periplasmática. A fracção apresentava uma coloração castanho-avermelhada e continha maioritariamente as proteínas presentes no espaço periplasmático. As células precipitadas foram seguidamente ressuspensas em 50 ml de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7.6. Para a obtenção das proteínas solúveis procedeu-se à ruptura das paredes celulares por aplicação de ultra-sons a 70 W (300 Watt High Intensity Ultrasonic Processor) mantendo a fracção em gelo para impedir a desnaturação das proteínas por aquecimento. Adicionou-se DNase I (SIGMA) para baixar a viscosidade mantendo-se em agitação durante 30 minutos, a 12 °C. A fracção solúvel foi obtida por ultracentrifugação a 180000 x g, a 8 °C, durante 1 hora. O "pellet" foi ressuspendido em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, num volume final de 300 ml. Nesta fase considerou-se preparada a fracção citoplasmática, constituída pelas proteínas solúveis.

A fracção membrana das células crescidas em meio enriquecido em selénio foi obtida a partir da fracção citoplasmática preparada como referido para as células crescidas em meio normal. O "pellet" que contém as membranas foi ressuspendido num volume mínimo de uma solução contendo 3% de coleato de sódio em tampão Tris-HCl. A mistura foi mantida em agitação durante a noite a 4 °C e posteriormente ultracentrifugada a 180000 x g, 45 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e dialisou-se, cerca de 12 horas, contra água destilada para remover o detergente. A fracção dialisada foi seguidamente concentrada num Diaflo (Amicon Corporation) equipado com uma membrana YM com uma porosidade de 30 kDa.

VII.3. Identificação e purificação da redutase do APS (proteína solúvel)

Todas as operações da purificação foram efectuadas a 4 °C e a pH 7.6, excepto quando mencionado em contrário. A pureza de todas as proteínas purificadas foi avaliada por espectroscopia de UV/visível, calculando a razão das absorvâncias entre o pico da proteína e o pico do cromóforo, e ainda por electroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes.

O extracto celular da fracção citoplasmática (~300 ml) foi aplicado numa coluna de DEAE-52 (*Whatman*, 5 x 15 cm) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e a fracção não adsorvida, que contém as proteínas não acídicas, foi eluída. Esta fracção é constituída maioritariamente por citocromos. Seguidamente aplicou-se um gradiente iónico contínuo entre 10 e 300 mM de tampão Tris-HCl, permitindo a eluição das proteínas adsorvidas à resina. Com o aumento da força iónica aplicada foi possível observar o aparecimento de várias bandas coloridas na coluna, correspondentes às diferentes proteínas. Nesta fase, e por comparação com purificações anteriormente efectuadas, verificou-se que a bactéria redutora de sulfato *D. desulfuricans* NJ possuía as proteínas redutase do APS, redutase do sulfito (do tipo desulforubidina), ferredoxina, para além de hidrogenase e de vários citocromos, tais como citocromo *c*₃, *split Soret* entre outros. Uma fracção castanho-amarelada que continha principalmente a redutase do APS foi recolhida entre 150 e 200 mM. Entre 250 e 300 mM foi eluída uma fracção, com cor avermelhada, que continha maioritariamente desulforubidina. As duas fracções foram dialisadas contra água destilada, durante uma noite. Após a diálise, a fracção da redutase do APS foi concentrada num Diaflo com membrana YM10, enquanto que no caso da desulforubidina se usou uma membrana YM30. Para a eluição das proteínas mais acídicas foi aplicado um gradiente linear contínuo de 300 a 500 mM em tampão Tris-HCl. A fracção principal de ferredoxina foi recolhida a uma força iónica entre 350 e 400 mM.

A partir desta etapa procedeu-se independentemente à purificação das proteínas redutase do APS e desulforubidina (secção seguinte).

VII.3.1. Purificação da redutase do APS

A fracção concentrada da redutase do APS foi aplicada numa coluna de HTP (*Whatman*, 2.5 x 10 cm), equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl, com o objectivo de separar o citocromo. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e uma fracção de redutase do APS livre de citocromos foi recolhida. A pureza da proteína foi avaliada pela razão da absorvância medidas a 278 e 387 nm. Nesta fase a proteína apresentava um espectro de absorção óptica característico, com uma razão de pureza A_{278}/A_{387} igual a 9.1. A fracção foi concentrada num Diaflo com uma membrana YM30 e posteriormente dialisada por adições sucessivas de água destilada durante a concentração. A terceira etapa da purificação foi efectuada num sistema de HPLC (*LKB*) equipado com uma coluna de permuta iónica DEAE-5PW (*Waters Associates*, 2.15 x 15 cm). Aplicou-se um gradiente linear entre 10 e 250 mM de tampão Tris-HCl, pH 7.0 durante 2 horas com um caudal de 3 ml/min. A fracção principal da redutase do APS foi eluída a uma força iónica à volta de 170 mM. Nesta fase a proteína encontra-se quase pura, apresentando uma razão $A_{278}/A_{387}=6.2$. Esta fracção foi concentrada e dialisada por adição de água segundo o método descrito anteriormente. Finalmente, a fracção concentrada foi aplicada numa coluna Mono-Q HR 5/5 (*Pharmacia*). Para a eluição usou-se um gradiente iónico linear entre 10 e 200 mM de tampão Tris-HCl, pH 7.0, com um caudal de 2 ml/min durante 50 minutos. A redutase do APS pura apresenta uma razão $A_{278}/A_{387} = 5.4$.

VII.3.2. Purificação de proteínas úteis para a classificação taxonómica da espécie em estudo

VII.3. 2.1. Desulforubidina

A fracção da desulforubidina recolhida após passagem na primeira coluna foi purificada posteriormente em HPLC. Um volume aproximado de 30 ml foi injectado numa coluna de DEAE-5PW e um gradiente de 10 a 300 mM de tampão Tris-HCl, pH 7.0 foi aplicado. A banda de desulforubidina foi recolhida a uma força iónica de ~250 mM em Tris-HCl, apresentando um coeficiente de pureza, A_{278}/A_{536} igual a 7.9.

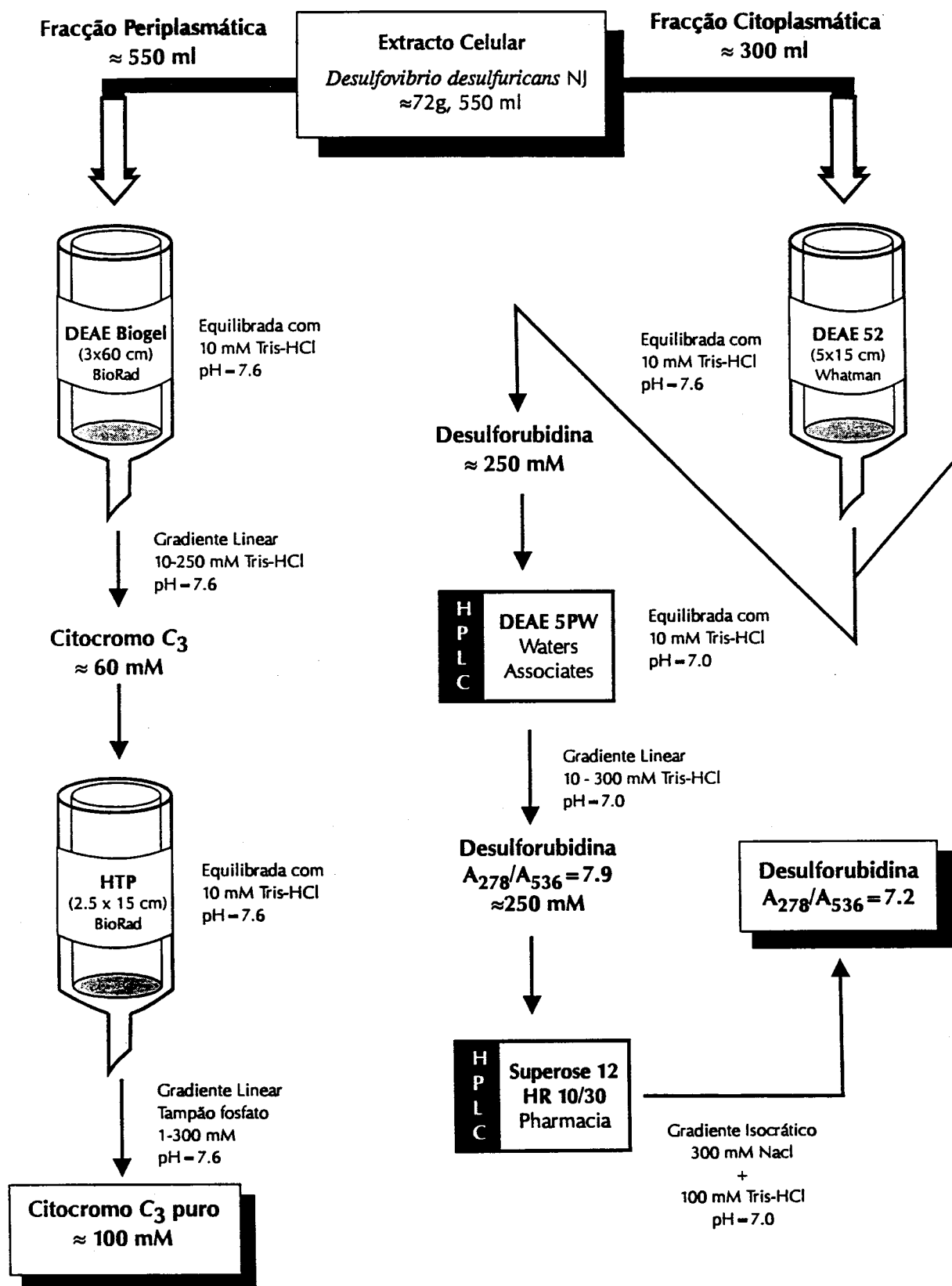
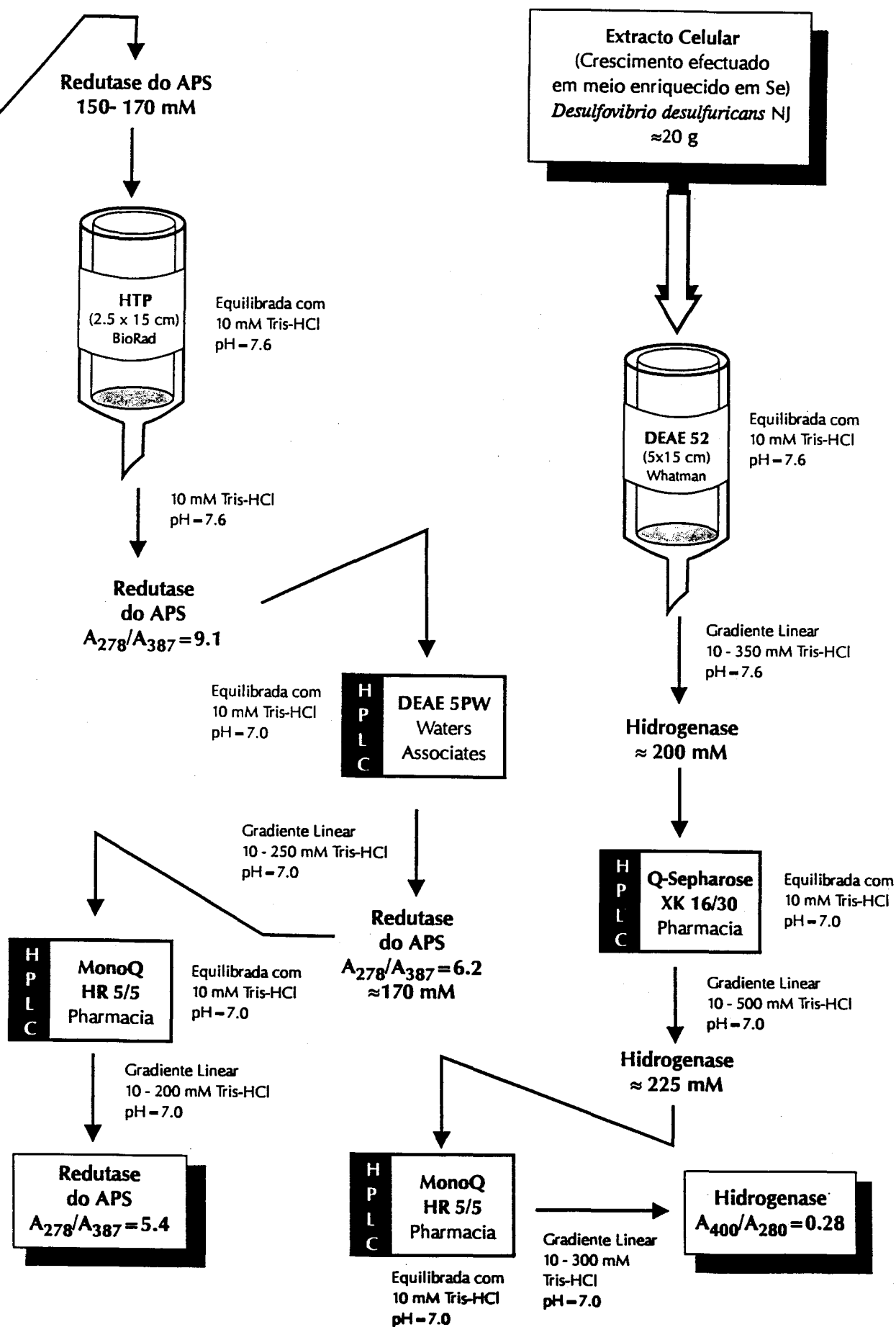


Figura VII.1. Representação esquemática da purificação das proteínas que predominam na espécie *Desulfovibrio desulfuricans* NJ.



A fracção recolhida foi concentrada num Diaflo com uma membrana YM30 e dialisada pela adição progressiva de água destilada. Esta fracção foi finalmente aplicada numa coluna de filtração em gel (Superose 12 HR 10/30, *Pharmacia*). A proteína foi eluída com um gradiente isocrático de 0.3 M NaCl em tampão 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0. Obteve-se uma fracção pura, com $A_{278}/A_{536} = 7.2$.

VII.3.2.2. Citocromo c_3 (periplasmático)

A purificação do citocromo c_3 é muito fácil quando comparada com as anteriormente descritas e normalmente obtém-se uma fracção pura após passagem numa coluna de DEAE seguida de uma coluna de HTP.

A fracção periplasmática, com um volume de 550 ml, foi aplicada numa coluna de permuta iónica DEAE-BioGel (3 x 60 cm), equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 10 a 500 mM Tris-HCl. Uma fracção contendo maioritariamente citocromo c_3 foi eluída a uma força iónica entre 50 e 75 mM de Tris-HCl. Esta fracção foi concentrada num Diaflo com uma membrana YM5 para um volume final de 5 ml e aplicada numa coluna de HTP (2.5 x 15 cm) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. Lavou-se a coluna com o mesmo tampão e aplicou-se um gradiente iónico linear de tampão fosfato entre 1 e 300 mM, com um volume total de 800 ml. A fracção considerada pura foi eluída a aproximadamente 100 mM.

VII.3.2.3. Hidrogenase membranar

A hidrogenase foi caracterizada por R. Franco (Tese de Doutoramento em preparação) como uma proteína do tipo [NiSeFe].

A purificação das proteínas descritas neste capítulo encontra-se representada esquematicamente na Figura VII.1.

VII.4. Caracterização das proteínas purificadas de *D. desulfuricans* NJ

VII.4.1. Caracterização da redutase do APS

A redutase do APS de *D. desulfuricans* NJ apresenta propriedades físico-químicas muito semelhantes às redutases isoladas de outras espécies do género *Desulfovibrio* (ver capítulos III e IV desta tese).^{8,9,10,11} Por electroforese em gel de poliacríalmida (12.5%) na presença de 0.1% de SDS verificou-se que a redutase do APS é constituída por duas subunidades com massa molecular igual a 60 (α) e 20 (β) kDa, respectivamente, quando comparada com a mobilidade dos padrões de calibração usados (Apêndice A).¹²

A massa molecular total, determinada por cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel (Superose 12 HR 10/30, *Pharmacia*), indicou uma massa aproximada de 158 kDa.

O teor em ferro foi determinado por métodos químicos seguindo a complexação entre o ferro no estado ferroso da amostra e o TPTZ.¹³ Obteve-se um número de 8 ± 1 átomos de ferro por 160 kDa, usando uma concentração de proteína determinada pelo método de Lowry.

O espectro de UV/visível da redutase do APS é típico desta classe de proteínas. Apresenta picos de absorção máxima a 278, 387 nm e uma banda larga entre 445 e 475 nm. O espectro global indica a presença de agregados de ferro-enxofre e grupos flavínicos e é apresentado na Figura VII.2. A adição de sulfito à proteína nativa origina a diminuição da absorvância na região compreendida entre 340 e 500 nm e um ligeiro aumento a 320 nm. Tal como observado anteriormente, a adição de sulfito reduz parcialmente os agregados ferro-enxofre e os grupos flavínicos. O aumento da absorvância a 320 nm evidencia a formação de um aducto entre o sulfito e a unidade flavínica.^{14,15}

As propriedades físico-químicas da redutase do APS de *D. d.* NJ estão sumarizadas na Tabela VII.1.

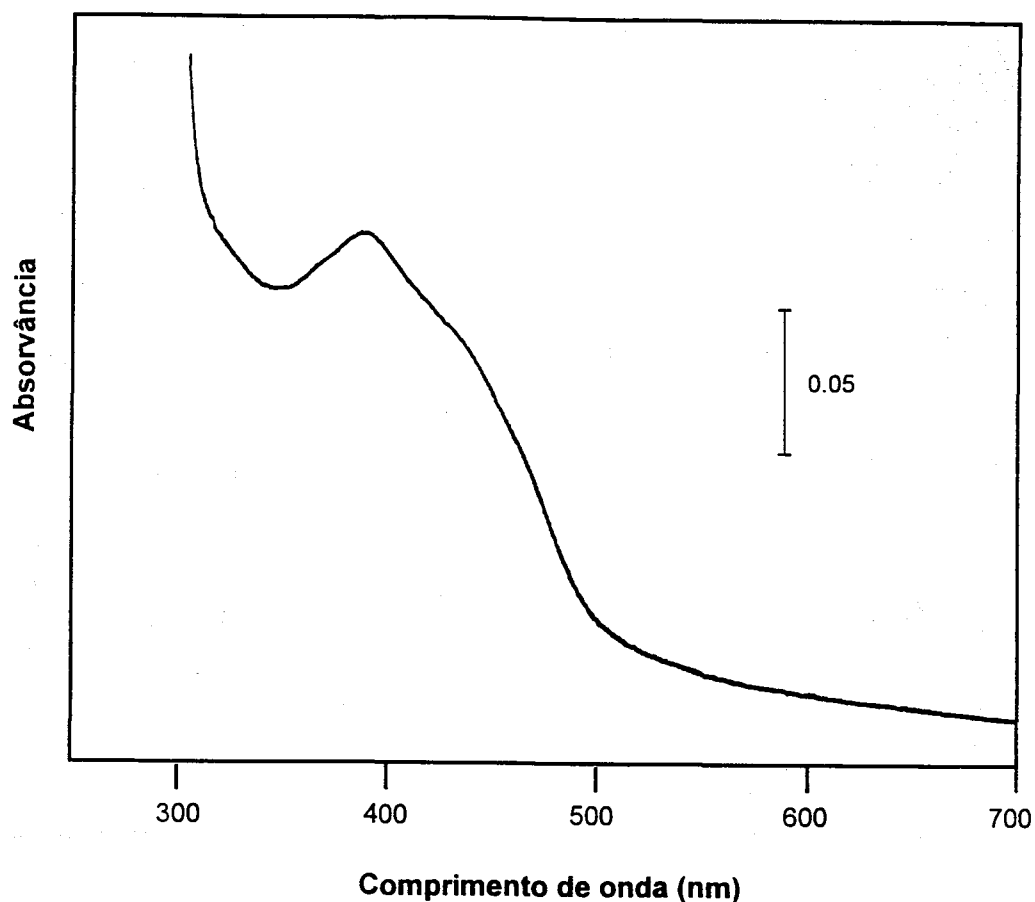


Figura VII.2. Espectro de UV/visível da redutase do APS purificada de *D. desulfuricans* NJ.

O espectro de RPE da redutase do APS no estado oxidado mostra um sinal quase isotrópico de baixa intensidade centrado a $g = 2.025$. A integração dupla deste sinal contabiliza menos de 0.2 spins/molécula. O comportamento deste sinal em função da variação da temperatura é semelhante ao do sinal do agregado $[3\text{Fe-4S}]$ observado na Fd II de *D. gigas* no estado oxidado.¹⁶

A adição sequencial de AMP à enzima reagida com sulfito causa profundas variações no espectro de RPE. É produzido um sinal rômbico com valores de g bem definidos, iguais a 2.096, 1.939, e 1.895, com a simultânea diminuição da intensidade do sinal isotrópico.

Tabela VII.1

*Caracterização físico-química e máximos de absorção
da redutase do APS isolada de D. desulfuricans NJ*

Propriedades físico-químicas	
Composição das subunidades	$\alpha_2\beta$
Massa Molecular (kDa)	~ 160.0 (60.0/ 20.0)
Teor em ferro (Fe/molécula)	8 ± 1
Espectroscopia de UV/visível	
Máximos de absorção (nm)	278 e 387
ϵ_{387} ($M^{-1}cm^{-1}$)	~ 55000
A_{278}/A_{387}	5.4
Formação de aducto FAD/sulfito	+ ①

① + indica a ocorrência de aducto após adição de sulfito

Este sinal rômboico corresponde a uma intensidade máxima de 0.48 spins por molécula e é idêntico ao observado na redutase do APS de *D. gigas*, obtido nas mesmas condições experimentais.¹¹ Por espectroscopia de Mössbauer foi demonstrado que este sinal é devido à redução de um agregado [4Fe-4S], denominado centro I.¹¹

A incubação da redutase do APS com ditionito de sódio (0.1 M, pH 9.5) durante um curto período de tempo (15 segundos) induz o desenvolvimento total do sinal atribuído ao centro I, que é caracterizado por um sinal rômboico ligeiramente diferente ($g = 2.079, 1.94, \text{ e } 1.897$) do anterior, sugerindo uma geometria de coordenação diferente. Por outro lado, a adição de ditionito implica a redução total do centro [3Fe-4S] que se torna silencioso em RPE. O espectro do centro I totalmente reduzido tem uma concentração de spins aproximadamente igual a 1 spin/molécula. O espectro da proteína totalmente reduzida apenas é obtido incubando a redutase com ditionito durante cerca de 30 minutos.

Observa-se a formação de um sinal de RPE complexo característico de agregados [4Fe-4S] em interação, o que implica a existência de pelo menos um outro centro [4Fe-4S]. A concentração de spins deste sinal corresponde a 1.47 spin/molécula.¹⁷

Na Figura VII.3 mostra-se uma sequência de espectros de RPE da enzima redutase do APS isolada de *D. desulfuricans* NJ.

Tabela VII.2

Resultados de RPE da redutase do APS de D. desulfuricans NJ

Espécies	Estado Redox	Valores de g	Concentração de spin (spin/molécula)
"g = 2.02" ("isotrópico")	Oxidado	2.029	0.16
Centro I	AMP + Sulfito	2.094, 1.945, 1.89	0.48
	Semi-reduzido (dicionito, 15 seg.)	2.079, 1.945, 1.90	~ 1.0
Centro I + Centro II	Totalmente reduzido	Interação de espécies (sinal de RPE complexo)	~ 1.5

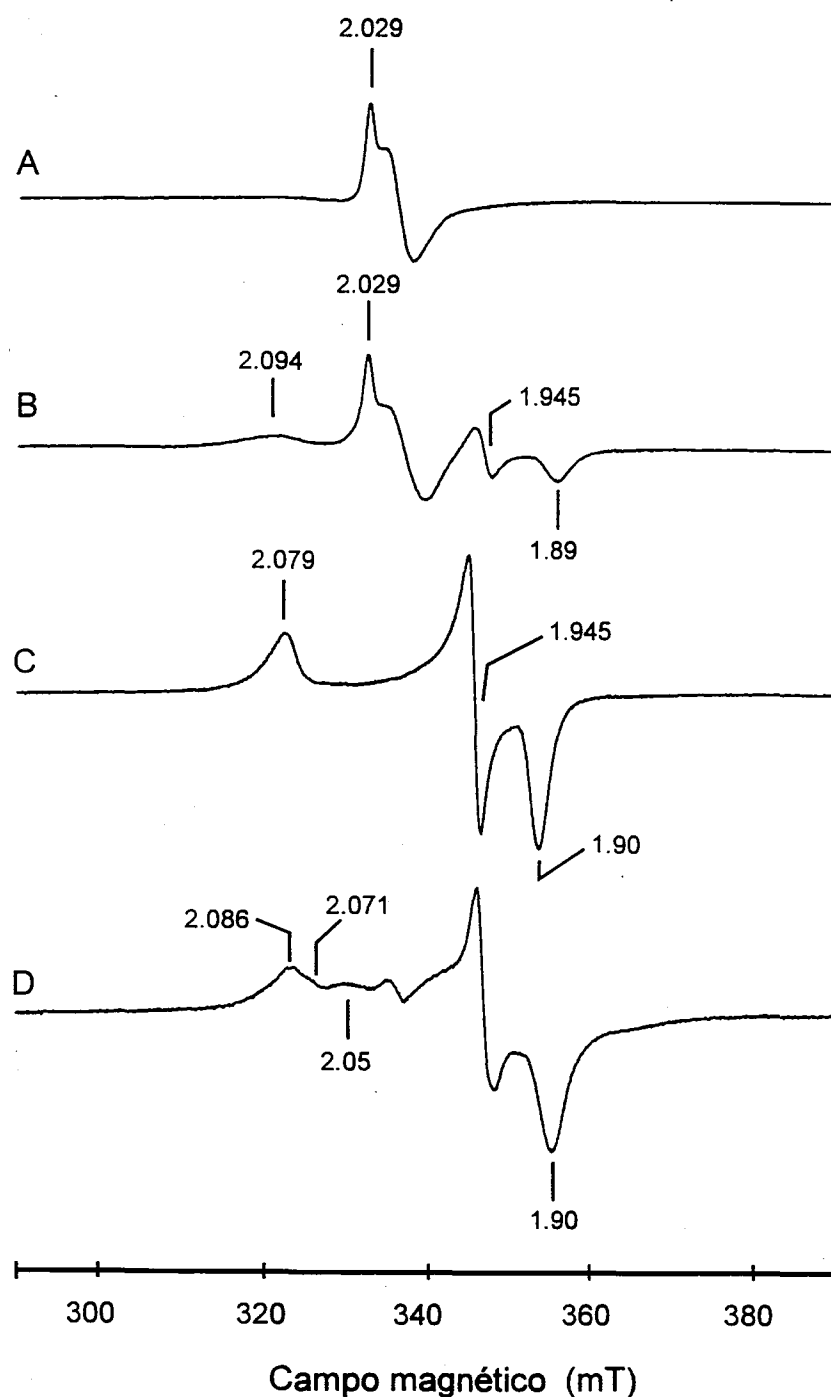


Figura VII.3. Efeito da adição de substratos naturais no espectro de RPE da redutase do APS de *D. desulfuricans* NJ. (A), enzima nativa; (B), enzima nativa reagida com sulfito e AMP; (C), enzima parcialmente reduzida com ditionito de sódio ($t < 1$ min, $\text{pH} \sim 9.5$); (D), enzima totalmente reduzida com ditionito de sódio ($t > 15$ min). Condições experimentais: temperatura, 8 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 2.37 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 8×10^3 .

VII.4.2. Caracterização da desulforubidina

Este estudo foi realizado em colaboração com a Dr. M. J. Feio e Prof. A. R. Lino. A coloração da fracção pura da redutase do sulfito é castanho-avermelhada, o que indica que pertence à classe das desulforubinas.¹⁸ A massa molecular determinada por electroforese em gel de poliacrilamida (17.5% em acrilamida) em condições desnaturantes revela três bandas após coloração com azul de Coomassie R-250, com massas moleculares aproximadas de 58 (α), 50 (β), e 11 (γ) kDa. A proteína apresenta uma massa molecular total de 240 kDa, sugerindo uma composição do tipo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Estes resultados estão de acordo com o observado por Arendsen e colaboradores para a desulforubidina isolada de *Desulfosarcina (Dsf.) variabilis*.¹⁹

O espectro de UV/visível da desulforubidina está representado na Figura VII.4. Exibe um pico de absorção máxima a 536 nm, observado em todas as desulforubidinas purificadas até à data.^{18,19,20} Outros picos são observados a 277, 398, e 582 nm.

O espectro global dá indicações da existência de grupos sirohemio assim como de centros ferro-enxofre. O coeficiente de extinção molar a 536 nm, calculado pelo método de Folin usando uma massa molecular de 240 kDa, revelou um valor igual a $60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tratamento da enzima com acetona/HCl resultou na extracção dos cromóforos. A complexação dos cromóforos com piridina possibilita a sua quantificação por espectroscopia de visível de acordo com o método de Siegel.²¹

O espectro de visível do complexo piridina/hemocromo é característico de grupos sirohemio. Os coeficientes de extinção molar usados, $\epsilon_{557} = 1.57 \times 10^4$ e $\epsilon_{588} = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, referem-se ao sirohemio e ao éster metilo-porfirina em piridina, respectivamente.²²

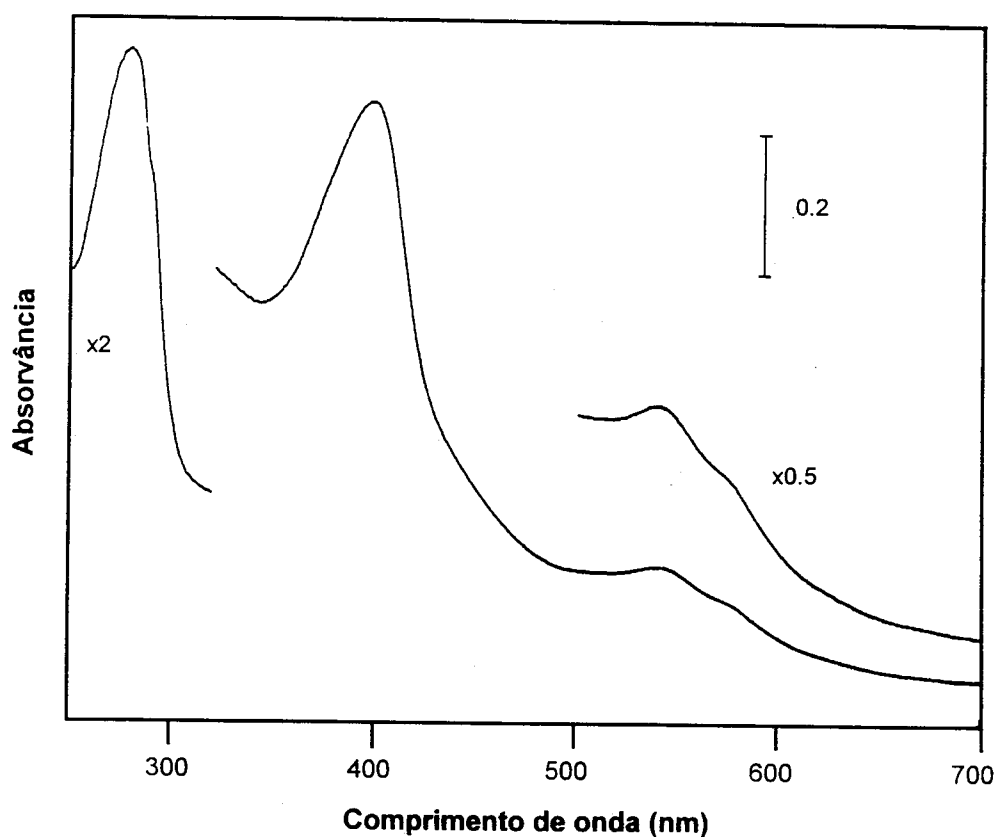


Figura VII.4. Espectro de UV/visível da desulforubidina de *D. desulfuricans* NJ.

A intensidade do espectro corresponde a aproximadamente 2 sirohemos extraídos por molécula de proteína. Verificou-se também que todas as moléculas de sirohemo contêm ferro na medida em que se obteve o mesmo número de sirohidroclorinas.

O conteúdo em ferro foi determinado colorimetricamente seguindo o método do TPTZ.¹³ Os resultados são concordantes aos observados em outras redutases do sulfito dissimilativas. Obtiveram-se 18 ± 1 átomos de ferro por molécula de desulforubidina.

No caso das desulforubidinas isoladas de *Dsm. baculatus* DSM 9974 e de *Dsf. variabilis*, e com base nos resultados obtidos pela espectroscopia de Mössbauer e pela quantificação do número de ferros, foi proposta a existência de quatro agregados [4Fe-4S] e dois grupos siro-hemo por molécula.

O espectro de RPE da desulforubidina no estado oxidado, adquirido a 5 K, é semelhante ao espectro de RPE da desulforubidina de *Dsm. baculatus* obtido por Moura e colaboradores.¹⁸ O espectro é dominado por um sinal de um íão férrico de spin alto ($S=5/2$) com valores de g iguais a 6.38, 5.25 e 1.98. É detectada ainda a presença de outra espécie com menor intensidade a $g=6.83$, ~ 5.0 , e ~ 1.9 (Figura VII.5).

Com base em resultados de Mössbauer, Moura e colaboradores propuseram para a desulforubidina de *Dsm. baculatus* um modelo de acoplamento antiferromagnético entre os grupos sirohemos e dois agregados [4Fe-4S], idêntico ao observado na redutase do sulfito assimilativa de *E. coli*.^{18,23}

Na Tabela VII.3 apresentam-se os resultados obtidos na caracterização preliminar da desulforubidina de *D. desulfuricans* NJ.

Tabela VII.3

Propriedades físico-químicas e espectroscópicas da desulforubidina de D. desulfuricans NJ★

Propriedades físico-químicas	
Composição das subunidades	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$
Massa Molecular (kDa)	240 (58.0/50.0/11.0)
Teor em ferro (Fe/molécula)	18 ± 1
Teor em sirohemio (sirohemio/molécula)	1.8
Espectroscopia de UV/visível	
Máximos de absorção (nm)	536, 398, 277
ϵ_{536} ($M^{-1}cm^{-1}$)	60000
A_{278}/A_{536}	7.2
Espectroscopia de RPE	
Valores de g	6.38, 5.25, 1.98 6.83, ~ 5.0 , ~ 1.9

★ Os dados foram obtidos em colaboração com a Prof. A.R. Lino e a Dra. M.J. Feio (referências 17 e 24).

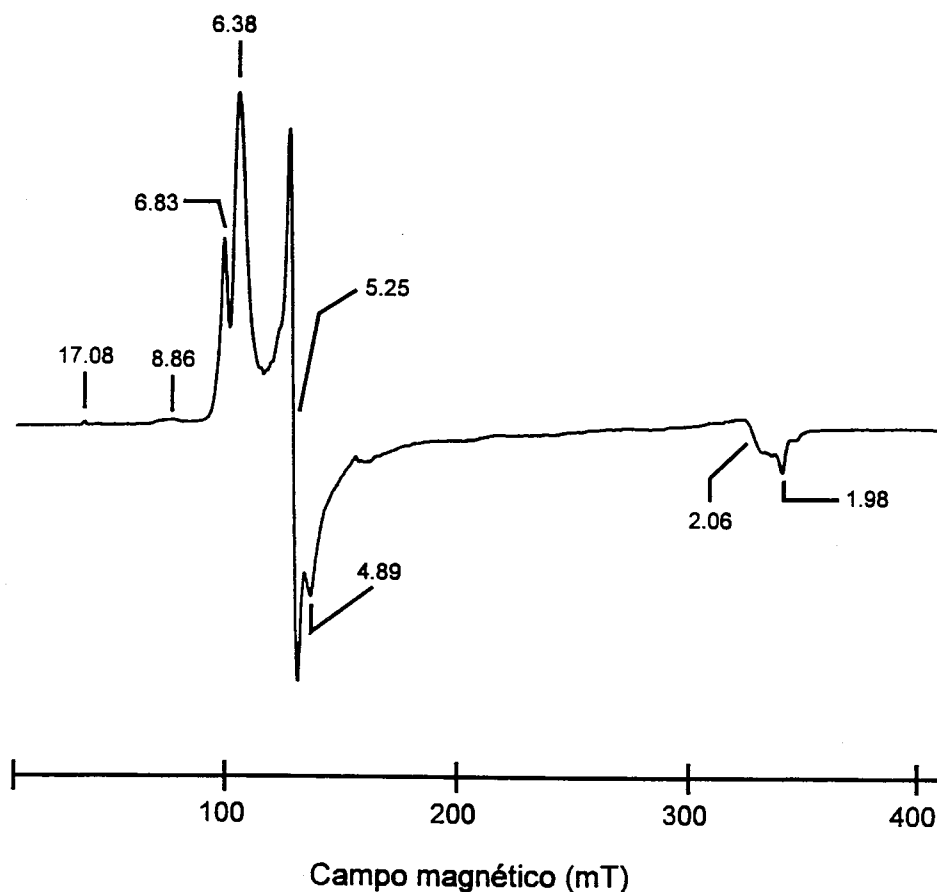


Figura VII.5. Espectro de RPE da desulforubidina de *D. desulfuricans* NJ, no estado oxidado. Condições experimentais: temperatura, 5 K; frequência da micro-onda, 9.43 GHz; potência da micro-onda, 74.9 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 2×10^4 .

VII.4.3. Caracterização do citocromo c_3 periplasmático

O citocromo c_3 purificado de *D. desulfuricans* NJ é uma proteína de baixa massa molecular, aproximadamente igual a 18 kDa (valor determinado por electroforese em gel de poliacrilamida, 12.5%, na presença de 0.1% de SDS e por cromatografia de filtração em gel).

A proteína contém quatro grupos hemo que estão covalentemente ligados à cadeia polipeptídica através de grupos tiolato pertencentes a resíduos de cisteína (ver estudo de RMN). Na Figura VII.6 apresenta-se a estrutura do grupo hémico do tipo c.

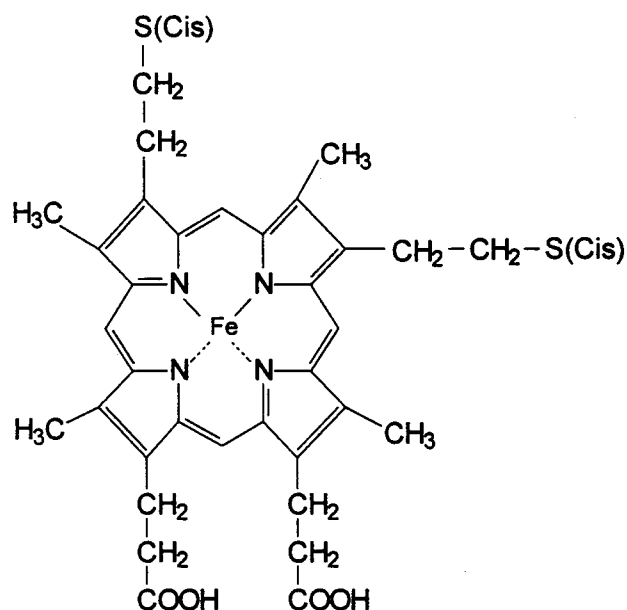


Figura VII.6. A estrutura do grupo hémico do citocromo c_3 . O proto-hemo liga-se covalentemente à proteína por coordenação com os átomos de enxofre de duas cisteínas da cadeia polipeptídica, formando pontes tioéter.

Os potenciais de oxidação-redução a meia-onda dos quatro grupos hemo foram determinados por voltametria cíclica num potenciostato PAR 273, como descrito por Moreno e colaboradores.²⁴ Cada amostra contém 80 μM de citocromo c_3 em tampão 200 mM Tris-maleato/100 mM KCl. Os valores obtidos estão compreendidos entre -110 e -370 mV. A pH 7.6, obtiveram-se valores iguais a -160, -220, -310 e -360 mV para os hemo 1, 2, 3, e 4, respectivamente.¹⁷

A sequência de ácidos aminados da região N-terminal (os primeiros 30 ácidos aminados) tem um elevado grau de homologia (> 90%) com o citocromo c_3 isolado de *Dsm. baculatus*.²⁵ A sequência de ácidos aminados e sua comparação com a proteína de *Dsm. baculatus* está apresentada na Figura VII.7.

	1				5					10
<i>D.d.</i> NJ	Ala	Asp	Ala	Pro	Gli	Asp	Asp	Tir	Val	Ile
<i>Dsm. b.</i>	Ala	Asp	Ala	Pro	Gli	Asp	Asp	Tir	Val	Ile

	11				15					20
<i>D.d.</i> NJ	Ser	Ala	Pro	Glu	Gli	Met	Lis	Ala	Lis	Pro
<i>Dsm. b.</i>	Ser	Ala	Pro	Glu	Gli	Met	Lis	Ala	Lis	Pro

	21				25					30
<i>D.d.</i> NJ	Pro	Gli	Asp	Lis	Pro	Gli	Thr	Leu	Gln	Lis
<i>Dsm. b.</i>	Lis	Gli	Asp	Lis	Pro	Gli	Ala	Leu	Gln	Lis

Figura VII.7. Comparação das sequências de ácidos aminados da região NH₂-terminal dos citocromos *c*₃ isolados de *D. desulfuricans* (*D.d.*) NJ e de *Dsm. desulfuricans* (*Dsm.b.*) Norway 4. Os ácidos aminados idênticos encontram-se circundados por traços (17).

O espectro UV/visível da proteína no estado oxidado e reduzido é apresentado na Figura VII.8. O espectro da proteína oxidada exibe um pico de absorção máxima a 404 nm (pico de Soret) e uma banda larga centrada a 530 nm. No estado reduzido, o espectro de visível é caracterizado pelo aparecimento de duas bandas a 552 e 523 nm e pelo desvio do pico Soret para aproximadamente 426 nm.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido extensivamente usada na caracterização dos citocromos multi-hêmicos purificados de bactérias redutoras de sulfato.²⁷ No estado oxidado o citocromo *c*₃ é paramagnético ($S=1/2$, Fe³⁺ hémico de spin baixo); após redução atinge-se um estado diamagnético devido à passagem do ião férrico do hemo ao estado ferroso ($S=0$, Fe²⁺ hémico de spin baixo). O paramagnetismo dos hemos no estado oxidado origina um deslocamento das ressonâncias hêmicas para campo baixo. A distribuição das ressonâncias atribuídas aos grupos metílicos dos grupos hêmicos tem sido usada como padrão na identificação do tipo de citocromo multi-hémico em estudo.²⁷

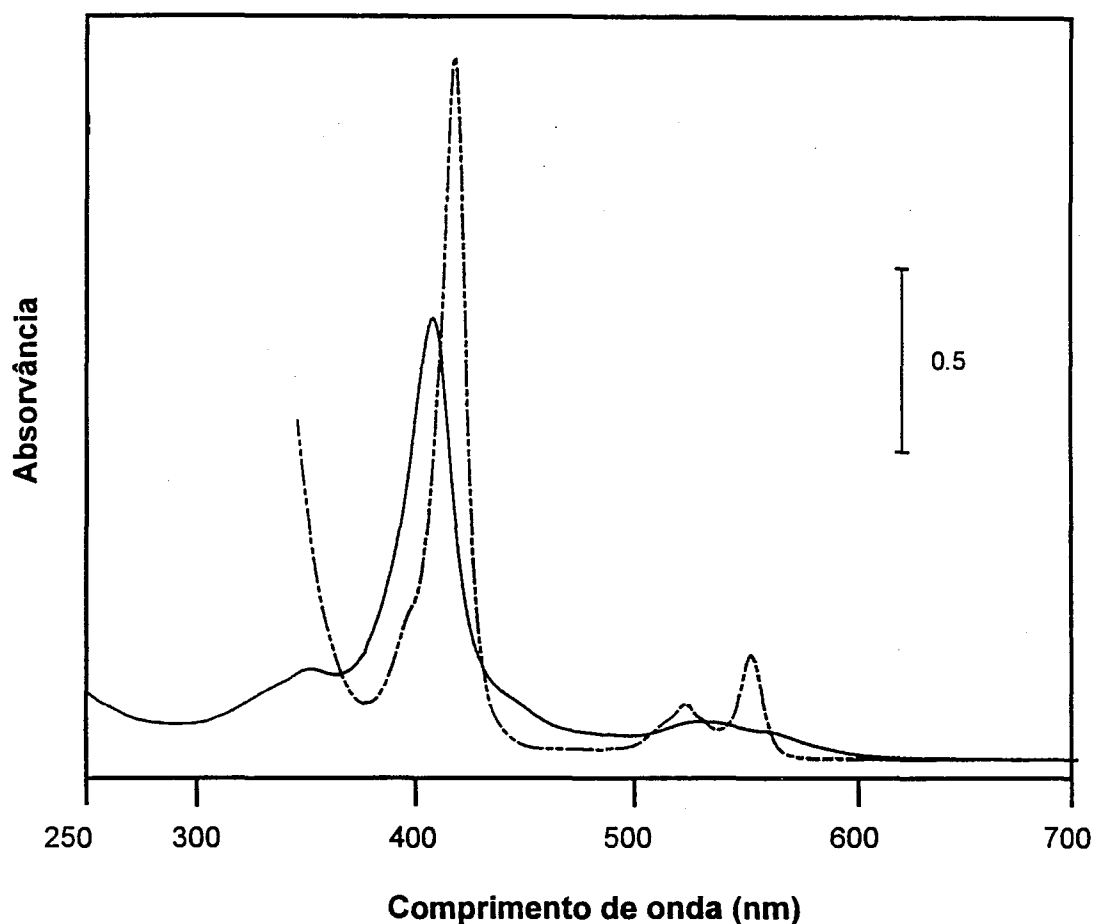


Figura VII.8. Espectro de UV/visível do citocromo c_3 de *D. desulfuricans* NJ, nos estados oxidado (—) e reduzido (- - - -).

O citocromo c_3 isolado de *D. desulfuricans* NJ apresenta uma grande homologia com a proteína de *Dsm. baculatus*, apoiando a homologia sequencial anteriormente apontada. O espectro de RMN da proteína no estado oxidado, adquirido a 326 K, apresenta duas ressonâncias (3 prótons cada) a campo baixo (< 25 ppm), tipicamente atribuídas aos grupos metilo do anel porfirínico dos hemos e uma outra (um próton) com desvio químico aproximado de 24 ppm (Figura VII.9).

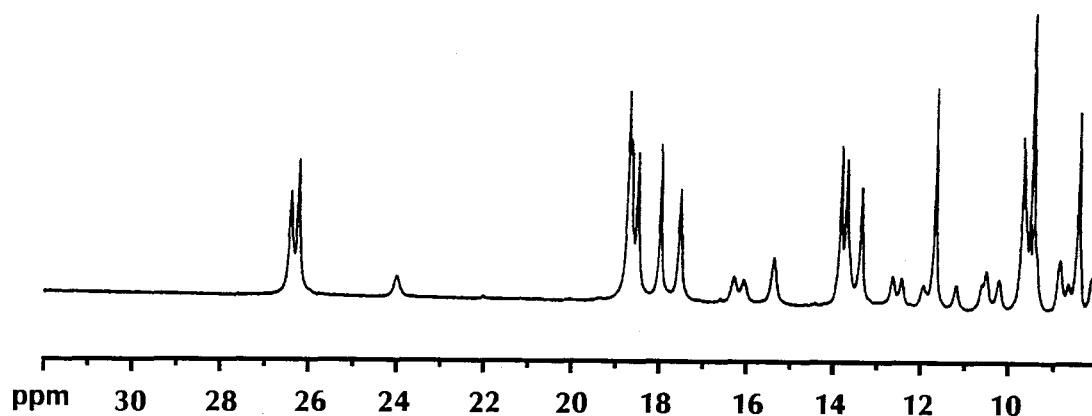


Figura VII.9. Espectro de ^1H -RMN do citocromo c_3 de *D. desulfuricans* NJ (região entre 5 e 30 ppm), no estado oxidado, adquirido à frequência central protônica de 300 MHz. Condições experimentais: concentração da amostra, $\sim 1\text{mM}$, $\text{pH}=7.2$; Temperatura, 326 K; n° de acumulações, 1024.

O espectro de RMN apresenta diferenças notáveis em relação aos obtidos para os citocromos homólogos isolados de *D. gigas*, *D. salexigens*, *D. vulgaris* ou *D. desulfuricans*, sugerindo diferenças estruturais dos quatro grupos hemo no citocromo de *D. desulfuricans* NJ.²⁷ No entanto, é importante referir que existe um elevado grau de homologia entre as diferentes proteínas, na medida em que em todos os casos, podem ser detectadas 10 a 12 ressonâncias no espectro de RMN (dos prótons dos grupos metilo dos quatro hemos) com desvios químicos inferiores a 10 ppm.

O espectro de RPE do citocromo c_3 no estado oxidado é característico dos citocromos isolados de espécies de bactérias redutoras de sulfato, apresentando um conjunto complexo de ressonâncias à volta de $g=3$, atribuídas à sobreposição do sinal de $g_{\text{máx}}$ dos quatro hemos. Em particular, é possível a detecção de uma ressonância muito alargada centrada a $g \sim 3.5$ (Figura VII.10). Tem sido sugerida a existência de um grupo hémico com uma orientação particular dos ligandos axiais His/His.^{27,28}

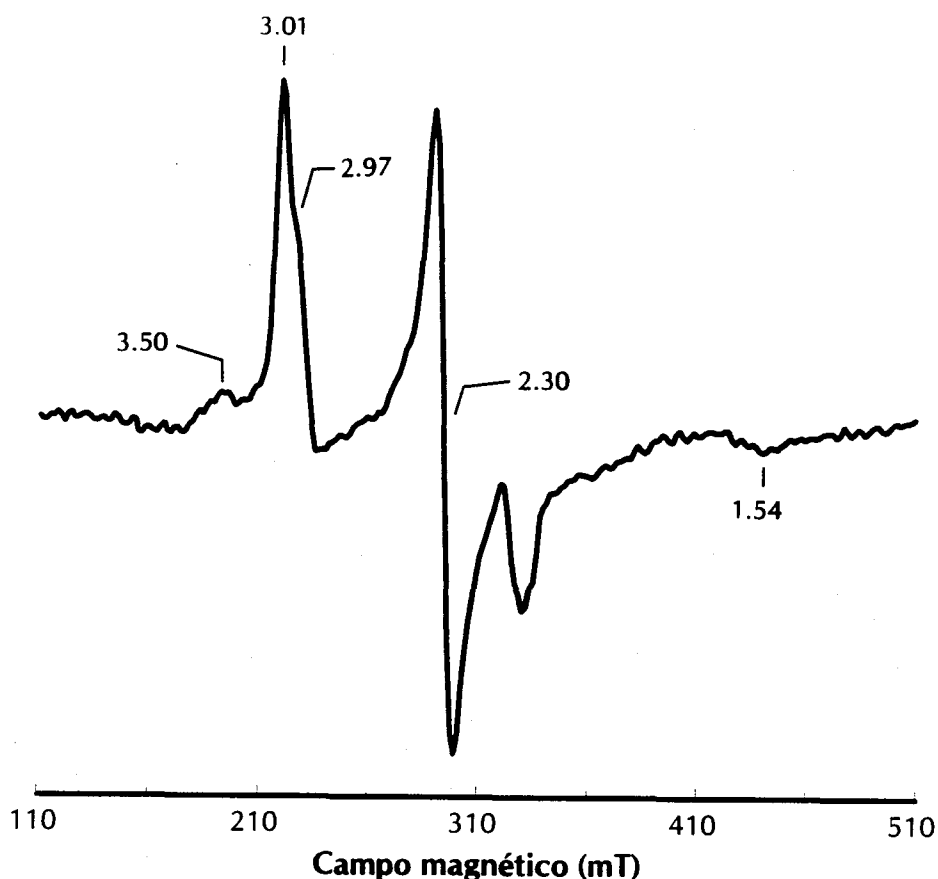


Figura VII.10. Espectro de RPE do citocromo c_3 de *D. desulfuricans* NJ, no estado oxidado, a pH=7.2. Condições experimentais: temperatura, 7.5 K; frequência da micro-onda, 9.44 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; modulação da amplitude, 1 mT; ganho, 1.6×10^5 .

VII.5. Discussão

Com o objectivo de correlacionar as características das proteínas predominantemente produzidas pela bactéria *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* estirpe New Jersey NICMB 8313, com o seu envolvimento na corrosão de metais ferrosos, foram purificadas e caracterizadas as proteínas citocromo c_3 , hidrogenase e redutases do APS e do sulfito. De um modo geral as proteínas purificadas de *Desulfovibrio desulfuricans* NJ apresentam propriedades físico-químicas e espectroscópicas muito semelhantes às proteínas homólogas isoladas das bactérias das espécies *Desulfomicrobium baculatus*.^{10,18,27,29}

O elevado grau de homologia encontrado entre as sequências de ácidos aminados da região NH₂-terminal dos citocromos c₃ de *D. desulfuricans* NJ e *Dsm. baculatus* poderá constituir uma evidência da proximidade filogenética destas duas espécies, bem como a detecção de uma redutase do sulfito do tipo desulforubidina. Esta homologia é ainda apoiada pelo facto da hidrogenase ter sido identificada como do tipo [NiSeFe].³⁰

Apesar do citocromo c₃ multi-hémico estar presente em todas as espécies do género *Desulfovibrio*, a comparação das sequências de ácidos aminados de seis citocromos c₃ relevou que apenas 20% dos resíduos são conservados, estando estes principalmente envolvidos na ligação dos grupos hémicos à cadeia polipeptídica (ver Tabela VII.4).³¹

Tabela VII.4

*Comparação das sequências de ácidos aminados da região NH₂-terminal dos citocromos c₃ isolados de diferentes organismos com o citocromo c₃ de *D. desulfuricans* NJ^①*

Organismo	Homologia (%)	Nº de a.a. idênticos na região comparada	Tamanho da região comparada (a.a.a)
<i>Dsm. baculatus</i> 9974	93.3	28	30
<i>Dsm. desulfuricans</i> Norway 4	93.3	28	30
<i>D. salexigens</i>	31.8	7	22
<i>D. desulfuricans</i>	57.1	12	21
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	28.6	2	7
<i>D. vulgaris</i> Miyzaki	28.6	2	7

① - comparação efectuada através do programa FAST P (32).

Foram já determinadas as estruturas tridimensionais (por cristalografia de Raios-X) dos citocromos c_3 de *D. vulgaris* Miyazaki F, *D. vulgaris* Hildenborough, *Dsm. desulfuricans* Norway 4 e *D. desulfuricans* ATCC 27774.^{26,33,34,35} A comparação das estruturas revelou que o enrolamento da cadeia polipeptídica, a posição e a orientação relativa dos quatro grupos hemo são semelhantes nas diferentes espécies, apesar do baixo grau de homologia das sequências de ácidos aminados.

A presença de uma redutase do sulfito do tipo desulforubidina apoia também a possibilidade da estirpe em estudo pertencer ao género *Desulfomicrobium*, apesar desta proteína também ter sido purificada da espécie *Desulfosarcina variabilis*.^{18,20}

A reclassificação da bactéria *Desulfomicrobium baculatus*, anteriormente denominada *Desulfovibrio baculatus*, foi proposta por Razanova e colaboradores.³⁶ O género *Desulfomicrobium* difere do género *Desulfovibrio* essencialmente na morfologia, no tipo de redutase do sulfito e na sequência de ácidos aminados dos seus citocromos c_3 (Tabela VII.5).

Tendo em conta o apresentando anteriormente, nomeadamente o tipo de proteínas (e as suas propriedades) produzidas e as semelhanças morfológicas e nutricionais com as bactérias *Desulfomicrobium baculatus* é proposta a reclassificação filogenética da espécie *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* New Jersey e a sua inserção no género *Desulfomicrobium*.

Tabela VII.5

Características morfológicas, nutricionais e bioquímicas dos géneros
Desulfomicrobium e *Desulfovibrio*^①

Espécie	16S rRNA ②	Forma	G+C (%)	DSV ③	DSRB ④	Menaquinona ⑤
<i>Desulfovibrio</i>						
<i>desulfuricans</i>	1	bastonete	59	+	—	MK-6
<i>vulgaris</i>	1	bastonete	65	+	—	MK-6
<i>gigas</i>	1	bastonete grande	65	+	—	MK-6
<i>africanus</i>		bastonete	65	+	—	MK-6 (H ₂)
<i>salexigens</i>	1	bastonete	49	+	—	MK-6 (H ₂)
<i>Desulfomicrobium</i>						
<i>baculatus</i>		esferas curtas	57	—	+	n.d.
<i>aspheronum</i>		esferas	52	—	+	n.d.

① - A tabela foi adaptada das referências (30) e (37)

② - os grupos 1 a 7 foram definidos por Devereux e colaboradores (30)

③ - DSV refere-se à desulfovirdina; (+) corresponde à presença e (-) à ausência da proteína

④ - DSRB refere-se à desulforubidina; (+) corresponde à presença e (-) à ausência da proteína

⑤ - apenas está referida a menaquinona principal (38)

n.d. - não descrito na literatura

VII.6. Bibliografia

1. Hamilton, W.A. 1985. *Ann. rev. Microbiol.* **39**, 195-217.
2. Widdel, F. 1988. In "Biology of anaerobic organisms", Ed. A.J. Zehnder, págs. 469-586, Wiley Interscience.
3. Lino, A.R., Franco, R., Barata, B., Pereira, A.S., Reis, M.A.M., Carvalho, J.M., Carrondo, M.J.T., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1991. *Microbial Corrosion* **8**, 210-212.
4. Lino, A.R., Feio, M.J., Franco, R., Pereira, A.S., Pinto, C., Reis, A.M., Beech, I., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1993. *J. Inorg. Biochem.* **51**, 192.
5. LeGall, J., Mazza, G., e Dragoni, N. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 385-387.
6. Teixeira, M. Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P.A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H.D., Jr, Xavier, A.V., LeGall, J., e Moura, J.J.G. 1987. *Eur. J. Biochem.* **167**, 47-58.
7. He, S.H., Teixeira, M., LeGall, J., Patil, D.S., Moura, I., Moura, J.J.G., DerVartanian, D.V., Huynh, B.H., e Peck, H.D., Jr. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 2678-2682.
8. Peck, H.D., Jr, Deacon, T.E., e Davidson, J.T. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 429-446.
9. Bramllet, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**, 2979-2986.
10. Lampreia, J., Moura, I., Xavier, A.V., LeGall, J., Peck, H.D., Jr., e Moura, J.J.G. 1991. In "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes", Ed. M. Franz, Vol. III pag. 333, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London.
11. Lampreia, J., Moura, I., Teixeira, M., Peck, H.D., Jr., LeGall, J., Huynh, B.H., e Moura, J.J.G. 1991. *Eur. J. Biochem.* **188**, 653-664.
12. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* **227**, 680-685.
13. Fisher, D.S., e Price, D.C. 1964. *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
14. Michaelis, G.B., Davidson, J.T., e Peck, H.D. Jr. 1970. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 321-328.

15. Lampreia, J., Fauque, G., Speich, N., Dahl, C., Moura, I., Truper, H.G., e Moura, J.J.G. 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 342-347.
16. Huynh, B.H., Moura, J.J.G., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., e Münck, E. 1980. *J. Biol. Chem.* **255**, 3242-3244.
17. Pereira, A.S., Franco, R., Feio, M.J., Pinto, C., Lampreia, J., Reis, M.A., Beech, I., Moura, I., Lino, A.R., e Moura, J.J.G. 1994. *J. Bacteriol.*, submetido para publicação.
18. Moura, I., LeGall, J., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr, Fauque, G., Xavier, A.V., DerVartanian, D.V., Moura J.J.G., e Huynh, B.H. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1075-1082.
19. Arendsen, A.F., Verhagen, M.F.J.M., Wolbert, R.B.G., Pierik, A.J., Stams, A.J.M., Jetten, M.S.M., e Hagen, W.R. 1993. *Biochem.* **32**, 10323-10330.
20. Lee, J.-P., Yi, C.-S., LeGall, J., e Peck, H.D., Jr. 1973. *J. Bacteriol.* **115**, 453-455.
21. Siegel, L.M. 1978. *Methods in Enzymology* **52**, 436-447.
22. Murphy, M.J., Siegel, L.M., Kamin, H., DerVartanian, D.V., Lee, J.P., LeGall, J., Peck, H.D., Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 82-88.
23. Christner, J.A., Münck, E., Janick, P.A., e Siegel, L.M. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 2098-2101.
24. Moreno, C., Campos, A., Teixeira, M., LeGall, J., Montenegro, M.I., Moura, I., Van Dick, C., e Moura, J.J.G. 1991. *Eur. J. Biochem.* **202**, 385-393.
25. Haser, R., Pierrot, M., Frey, M., Payan, F., Astier, J.P., Bruschi, M., and LeGall, J. 1979. *Nature* **282**, 806-810.
26. Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., Fauque, G., LeGall, J., moore, G.R., e huynh, B.H. 1985. *Rev. Port. Quím.* **27**, 212-215.
27. Pierrot, M., Haser, P., Frey, M., Payan, F., Astier, J.P. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**, 14341-14348.

28. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A.V., Moura, J.J.G., Fauque, G., Prikril, B., e LeGall, J. 1985. *Rev. Port. Quím.* 27, 194-195.
29. Devereux, R., He, S.-H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeGall, J., e Whitman, W.B. 1990. *J. Bacteriol.* 172, 3609-3619.
30. LeGall, J., e Fauque, G. 1988. In "Biology of anaerobics microorganisms", Ed. A.J. Zehnder, pág. 587-639, John Wiley & Sons, Inc., New York.
31. Lipman, D.J., e Pearson, W.R. 1985. *Science* 227, 1435-1441.
32. Higushi, Y., kusanaki, M., Yasuota, N., Kakuko, N., e Yagi, T. *J. Biochem. (Tokyo)* 90, 1715-1723.
33. Matias, P.M., Frazão, C., Morais, J., Coll, M., e Carrondo, M.A. 1993. *J. Mol. Biol.* 234, 680-899.
34. Frazão, C., Morais, C., Matias, P.M., e Carrondo, M.A. 1994. *Acta Cryst. Section D* 50, 233-236.
35. Razanova, E.P., Nazina, T.N., e Galushko, A.S. 1988. *Mikrobiologia* 57, 634-641.
36. Devereux, R., e Stahl, D. 1991. In "The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives", Eds. J.M. Odom e R. Singleton, Jr., pág. 131-159, Springer-Verlag.
37. Collins, M.D., e Widdel, F. 1986. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 8-18.

CAPÍTULO VIII

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA DA BACTÉRIA *DESULFOMICROBIUM BACULATUS* DSM 9974

VIII. Purificação e caracterização de uma nova proteína de Desulfomicrobium baculatus DSM 9974

1. Introdução	275
2. Crescimento bacteriano e purificação da proteína P ₅₇₂	278
3. Determinação da massa molecular e composição das subunidades	279
4. Composição de ácidos aminados	283
5. Sequência de ácidos aminados da região NH ₂ -terminal	284
6. Determinação do conteúdo em ferro	285
7. Determinação do conteúdo em sirohemio	285
8. Determinação do conteúdo em flavina	286
9. Espectroscopia de UV/visível	287
10. Espectroscopia de RPE	289
11. Discussão	291
12. Bibliografia	296

VIII.1. Introdução

A redução da molécula de sulfito é uma reacção hexa-electrónica que é catalisada pelas redutases do sulfito, constituindo uma das reacções centrais do ciclo do enxofre. Está presente em diversos sistemas biológicos, ocorrendo em bactérias, plantas, organismos unicelulares, tais como leveduras e fungos, e ainda em todos os organismos autotróficos.

Como anteriormente referido (Capítulo I), existem dois tipos de redutases do sulfito, as *redutases do sulfito assimilativas*, que estão envolvidas na síntese de compostos sulfurados e as *redutases do sulfito dissimilativas* que participam no processo de respiração anaeróbica, para obtenção de energia.

Durante a purificação da redutase do APS de *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974, usada em estudos comparativos, foi identificada uma proteína nova que apresenta propriedades fisico-químicas semelhantes à redutase do sulfito assimilativa de *Escherichia coli*.

As redutases do sulfito assimilativas catalisam a redução directa da molécula de sulfito, sem a formação de compostos intermediários, tais como, tritionato e tiosulfato. Foram já isoladas as redutases assimilativas das bactérias anaeróbicas, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Methanosarcina* (Ms.) *barkeri*, *Desulforomonas* (Drm.) *acetoxidans* e *Salmonella typhimurium*, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*.^{1,2,3,4,5,6} No entanto, o sistema melhor estudado é a redutase do sulfito isolada de *E. coli* que tem sido alvo de estudo desde 1972 por Siegel e colaboradores. No género das bactérias redutoras de sulfato, apenas nas bactéria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e *Dsm. desulfuricans* Norway 4 foi identificada uma redutase do sulfito assimilativa. Destas mesmas estirpes já tinha sido isolada e caracterizada uma redutase do sulfito dissimilativa (do tipo desulfovirdina em *D. vulgaris* e do tipo desulforubidina em *Dsm. desulfuricans*).^{1,7,8} A presença de dois tipos de redutases do sulfito no mesmo organismo é surpreendente, na medida em que o organismo possui uma via metabólica, a redução dissimilativa do sulfato, através da qual são produzidas grandes quantidades de compostos

que contêm enxofre reduzido, em princípio disponível para a posterior incorporação na via biossintética de compostos sulfurados.

Tal como na bactéria *D. vulgaris* Hildenborough, foi isolada uma segunda redutase do sulfito, da espécie *Desulfomicrobium (Dsm.) baculatus* DSM 9974. A primeira redutase do sulfito que foi isolada é do tipo desulforubidina. Esta proteína é um oligómero de massa molecular elevada, compreendida entre 200 e 240 kDa.^{9,10,11,7} É composta por três subunidades diferentes organizadas numa configuração do tipo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, com massa molecular igual a 50 kDa (α), 40 kDa (β) e 11 kDa (γ), respectivamente. No estado oxidado o espectro de UV/visível apresenta picos de absorção máxima a 545, 398 e 280 nm, que lhe confere uma coloração castanho-avermelhada. A desulforubidina contém quatro agregados [4Fe-4S] e dois grupos sirohemo (Figura VIII.1) que estão magneticamente acoplados a dois dos agregados ferro-enxofre.⁷ O espectro de RPE da forma oxidada apresenta um sinal correspondente ao átomo de ferro no estado férrico de spin alto, com valores de g a 6.43, 5.34, e 1.97, idêntico ao observado na subunidade HP da redutase do sulfito de *E. coli*.¹²

A redutase do sulfito assimilativa de *D. vulgaris* Hildenborough é composta por uma única cadeia polipeptídica de baixa massa molecular (27 kDa) que contém um grupo sirohemo e um agregado [4Fe4S] por molécula.^{1,2,3} Contrariamente às restantes redutases assimilativas, não possui qualquer unidade flavínica. Na presença de viologénio de metilo tem a capacidade de reduzir o sulfito. O seu espectro de visível, no estado oxidado, apresenta picos de absorção máxima a 590, 545, e 405 nm, que é semelhante mas não idêntico ao espectro óptico da redutase do sulfito de *E. coli*.³³ A ausência de um pico a 714 nm, característico de complexos Fe^{3+} /isobacterioclorinas, indica que o átomo de ferro do sirohemo poderá estar num estado de spin diferente.^{13,14} O espectro de RPE da proteína oxidada, a 12 K, revela a presença de uma só espécie. O sinal observado com valores de g iguais a 2.44, 2.36, e 1.77 indica que o átomo de ferro do grupo sirohemo se encontra no estado férrico de spin baixo, contrariamente ao verificado na redutase do sulfito de *E. coli* (ou das redutases do sulfito dissimilativas) que é isolada com o sirohemo no estado de spin alto ($S=5/2$).¹⁵ Com base em estudos de RPE de compostos modelo foi sugerido que na redutase do sulfito de *D. vulgaris* o sirohemo poderá estar hexacoordenado.

(ou das redutases do sulfito dissimilativas) que é isolada com o sirohemo no estado de spin alto ($S=5/2$).¹⁵ Com base em estudos de RPE de compostos modelo foi sugerido que na redutase do sulfito de *D. vulgaris* o sirohemo poderá estar hexacoordenado.

Seguidamente será descrita a purificação e caracterização preliminar de uma nova redutase do sulfito, identificada durante a purificação da desulforubidina da bactéria redutora de sulfato *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974. Esta proteína apresenta propriedades fisico-químicas diferentes das redutases assimilativas descritas até à data, tendo sido designada por proteína P₅₇₂, por exibir um pico de absorção máxima à volta dos 572 nm.

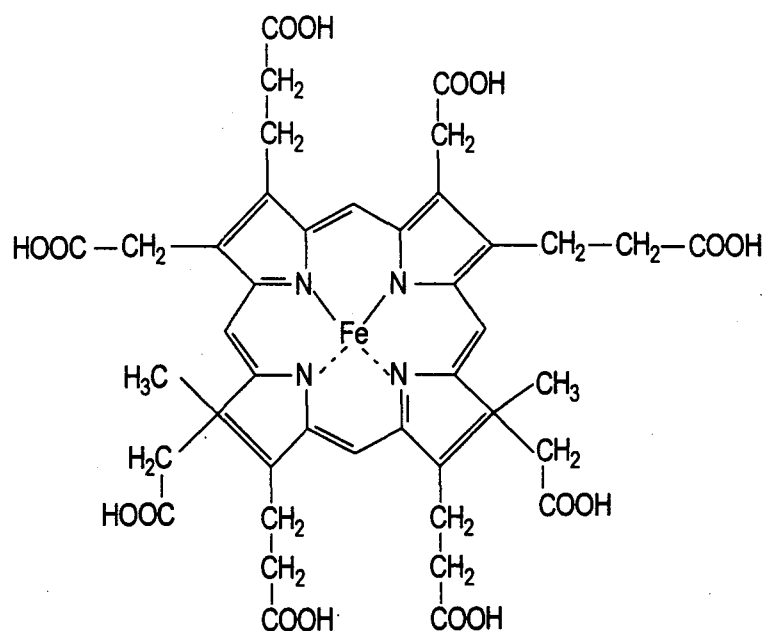


Figura VIII.1. Estrutura da unidade sirohemo. Adaptado de Stolzenberg e colaboradores (13).

VIII.2. Crescimento bacteriano e purificação da proteína P₅₇₂

A bactéria *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974 tem como origem uma cultura mista, designada por *Chloropseudomonas ethylica* N₂, crescida a 30 °C em meio contendo enxofre elementar como aceitador de electrões.¹⁶ Primeiramente classificada como *Desulfovibrio* 9974, foi posteriormente classificada como *Desulfovibrio baculatus* 9974. Recentemente uma reclassificação foi sugerida, por comparação com a estirpe *Desulfovibrio desulfuricans* Norway 4, sendo classificada como *Desulfomicrobium (Dsm.) baculatus* 9974.¹⁷

As células de *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974 foram crescidas anaerobicamente a 37 °C, num meio de cultura que contém lactato como fonte de carbono e sulfato como aceitador final de electrões, segundo o método descrito por LeGall e colaboradores, num volume total de cerca de 400 litros.¹⁸ O extracto celular de *Dsm. baculatus*, aproximadamente 1200 ml, foi aplicado numa coluna de DEAE-52 previamente equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl. Seguidamente procedeu-se à lavagem da coluna com o mesmo tampão, para separar as proteínas não ácidas, maioritariamente citocromos, que não adsorveram à resina. As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente iónico linear crescente de tampão Tris-HCl, entre 10 e 500 mM, num volume total de 2 litros. Uma fracção, com coloração castanho-avermelha, contendo a proteína P₅₇₂ e alguma desulforubidina foi eluída a uma força iónica entre 200 e 250 mM, entre a banda da rubredoxina (menos ácida) e a banda da desulforubidina (mais ácida). A fracção recolhida foi concentrada num concentrador do tipo Diaflo equipado com uma membrana porosa de exclusão molecular YM10 e posteriormente dialisada por adições sucessivas de água destilada após cada concentração. A fracção, deste modo preparada, foi seguidamente purificada por HPLC (*Beckman Instruments*) usando uma coluna semi-preparativa DEAE SPW (*Waters Associates*). Aplicou-se um gradiente linear entre 10 e 300 mM NaCl em 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7.0, durante 3 horas, com um caudal de 2 ml/min. A banda correspondente à absorção da proteína P₅₇₂ foi eluída a ~200 mM, com um coeficiente de pureza, determinado pela razão A₂₇₈/A₅₇₂, de 17.0. A fracção recolhida foi concentrada num Diaflo (YM30) e dialisada segundo o procedimento descrito na etapa anterior. A fracção concentrada de P₅₇₂ (~2 ml) foi finalmente aplicada numa

coluna Mono-Q HR 16/10 (*Pharmacia*). As proteínas foram eluídas com um gradiente linear compreendido entre 10 e 300 mM NaCl em tampão 10 mM fosfato, pH 7.0, com um caudal de 2 ml/min. A proteína obtida, com uma razão $A_{278}/A_{572}=9.2$, foi avaliada quanto à pureza por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) em condições não desnaturantes (Apêndice A) e por cromatografia de filtração em gel. O facto de apenas ter sido detectada uma única banda permitiu concluir que a proteína possuía um grau de pureza superior a 95%.

Na Figura VIII.2 apresenta-se um esquema da purificação da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus* 9974.

VIII.3. Determinação da massa molecular e composição das subunidades

A massa molecular da proteína P₅₇₂ foi determinada por cromatografia de exclusão molecular em sistema de HPLC, usando uma coluna de filtração em gel TSK G3000 SW (LKB) com limites de exclusão molecular entre 5 e 300 kDa. Foi utilizado um tampão de eluição 0.3 M em NaCl e 0.1 M em Tris-HCl, pH 7.0 com um caudal de 0.15 ml/min. Como proteínas padrão foram usadas a aldolase (158 kDa), a albumina do soro de bovino (66 kDa), a ovalbumina (43 kDa), a anidrase carbónica (29 kDa), a ribonuclease A (13.7 kDa) e o citocromo c de cavalo (12.4 kDa). O cromatograma obtido está representado na Figura VIII.3, tendo sido estimada uma massa molecular de 151 ± 4 kDa para a proteína P₅₇₂.

A composição das subunidades foi determinada por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%) na presença de 0.1% de SDS, a pH 8.8, segundo o método de Laemmli.¹⁹

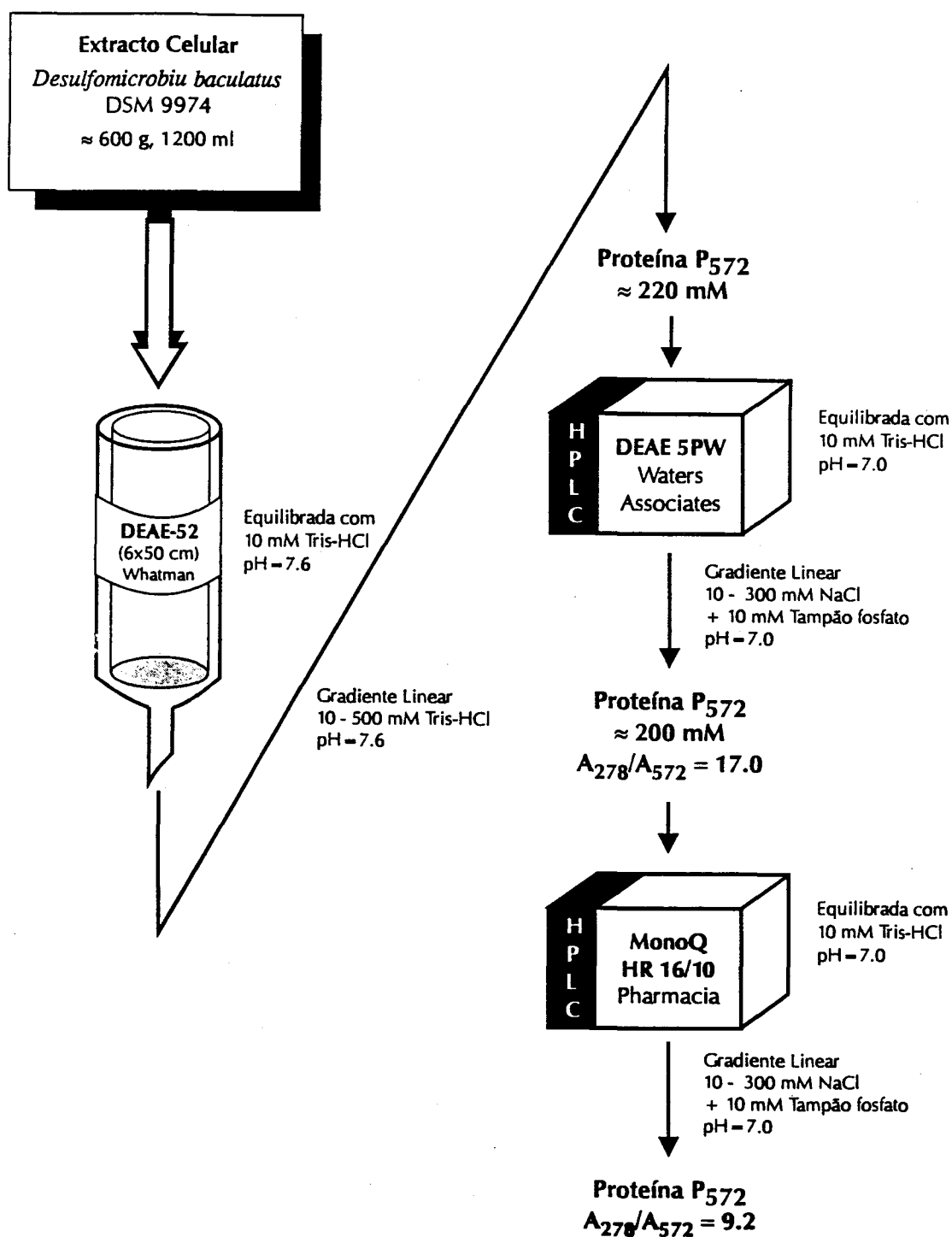


Figura VIII.2. Esquema de purificação da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus* 9974.

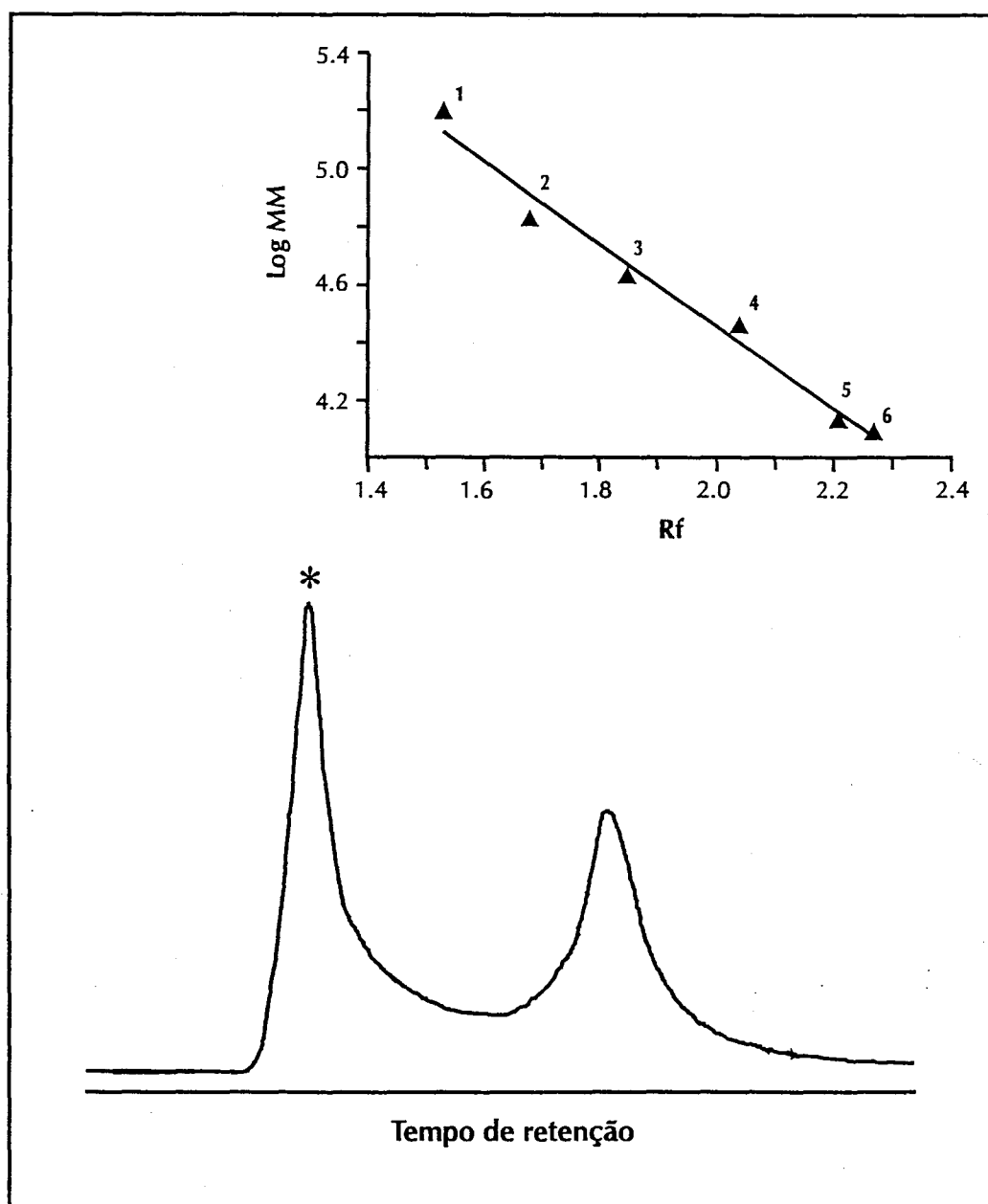


Figura VIII.3. Determinação da massa molecular da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus*, por cromatografia de filtração em gel numa coluna TSK G-3000 SW. O asterisco indica a banda correspondente ao azul de dextrano 2000 (*Pharmacia*). A curva de calibração da massa molecular foi construída usando os seguintes padrões: 1, aldolase (158 kDa); 2, Albumina do soro de bovino (66 kDa); 3, ovalbumina (43 kDa); 4, anidrase carbónica (29 kDa); 5, ribonuclease A (13.7 kDa); e 6, citocromo c de cavalo (12.4 kDa).

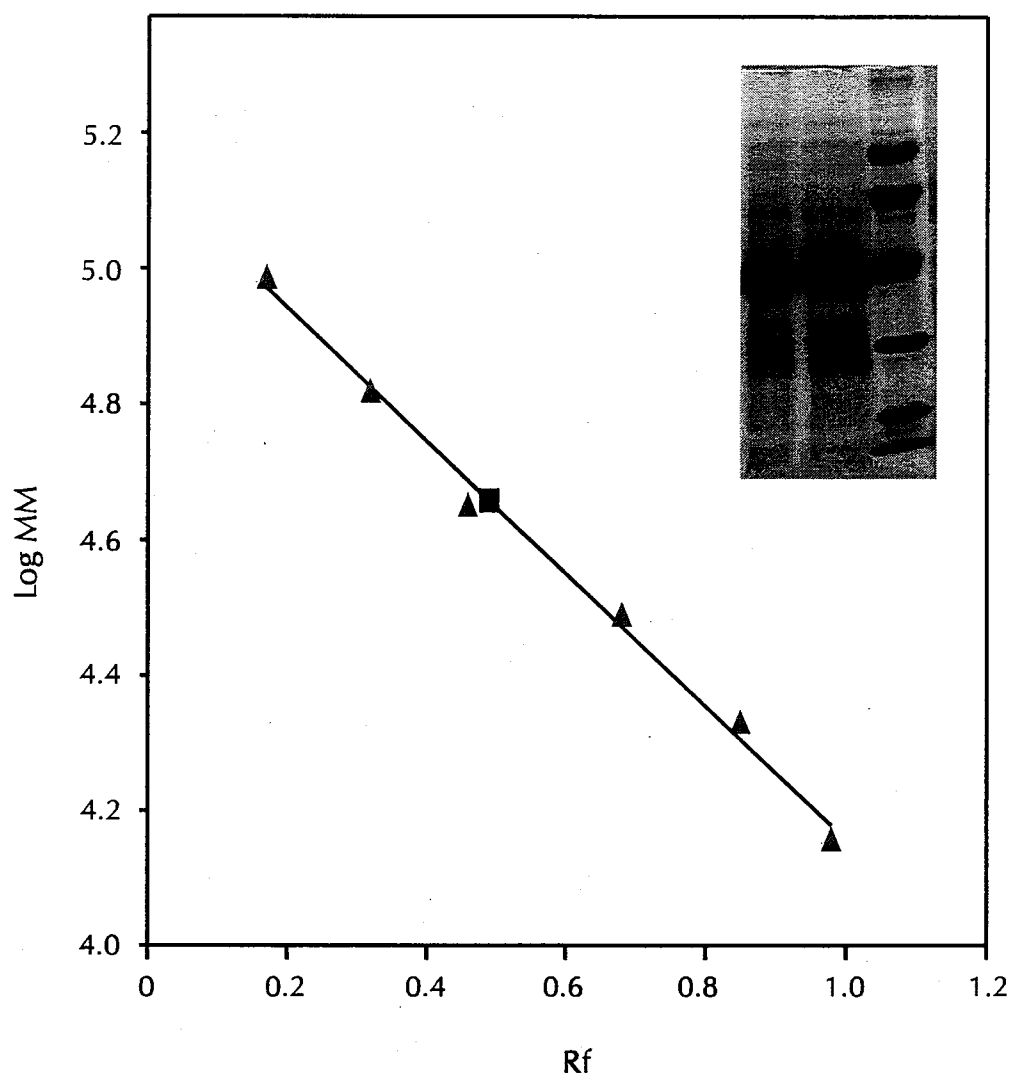


Figura VIII.4. Determinação das subunidades da proteína P₅₇₂ por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5% em acrilamida) na presença de 0.1% de SDS.

Após coloração do gel com Azul de Coomassie R-250, observou-se uma única banda com uma massa molecular aparente de 45.5 ± 0.5 kDa, quando comparada com os padrões (Figura VIII.4). A massa molecular das subunidades foi também estimada por espectrometria de massa (espectrómetro "electrospray" Fisons VG) e o resultado obtido, 45.346 kDa, é consistente com o observado por electroforese.

VIII.4. Composição de ácidos aminados

A composição em ácidos aminados foi determinada por hidrólise ácida de acordo com o método de Moore e Stein, em 200 µl de uma solução 6 N de HCl a 110 °C durante 22, 44 e 72 horas.²⁰ A análise de ácidos aminados foi efectuada num analisador automático (*Beckman High Performance Analyzer System 6300 E*).²¹ O conteúdo e composição em ácidos aminados vem descrito na Tabela VIII.1.

Tabela VIII.1

*Composição aproximada de ácidos aminados da proteína P₅₇₂
isolada de Dsm. baculatus 9974★*

Ácido aminado			
Asp + Asn	40	Ile	27
Tre	15	Leu	36
Ser	21	Tir	15
Glu + Gln	43	Fen	16
Gli	29	His	15
Ala	35	Lis	28
Cis	4-5	Arg	15
Val	27	Pro	24
Met	17	Trp	n.d.
Total de ácidos aminados	407		
Massa Molecular (Da)	45938		

★- Os cálculos têm como base uma massa molecular de 45.4 kDa.

n.d. - não determinado

VIII.5. Sequência de ácidos aminados da região NH₂-terminal

A sequência de ácidos aminados da região NH₂-terminal foi efectuada num sequenciador automático Applied Biosystem Model 477A acoplado a um analisador de ácidos aminados (Applied Biosystem Model 120A). Uma amostra pura da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus* muito bem dialisada foi sujeita sequencialmente à degradação de Edman, tendo sido determinada a sequência dos 29 primeiros ácidos aminados. Os resultados vêm confirmar a presença de uma única cadeia polipeptídica, tal como observado por electroforese em condições desnaturantes. A Figura VIII.5 mostra a sequência de ácidos aminados da região NH₂-terminal da proteína P₅₇₂.

	1				5					10
<i>Dsm.b.</i>	Met	Val	Tre	Glu	Ile	Lis	Lis	Asp	Ile	Tir
<i>Dsm.d.</i>	Pro	Val	Tre	Glu	Ile	Lis	Lis	Asp	Ile	Tir
<i>D.v.</i>	Met	Ser	Asp	Glu	Pro	Lis	Gli	Ala	Ile	Leu
	11				15					20
<i>Dsm.b.</i>	(?)	Val	Gli	Val	Val	Asp	Trp	Asn	Ile	(?)
<i>Dsm.d.</i>	Trp	Val	Gli	Val	Val					
<i>D.v.</i>	Gln	Arg	Asp	Lis	Leu	Tre	Tir	Ala	Ile	Val
	21				25					
<i>Dsm.b.</i>	Asp	Fen	(?)	Gli	Tir	Asp	Lis	Ser	Pro	
<i>D.v.</i>	Pro	Arg	Tre	Pro	Cis	Gli	Leu	Leu	Tre	

Figura VIII.5. Comparação das sequências N-terminal da proteína P₅₇₂ isolada de *Dsm. baculatus* DSM 9974 (*Dsm. b.*) com a proteína homóloga de *Dsm. desulfuricans* Norway 4 (*Dsm. d.*) e com a redutase do sulfito assimilativa de *D. vulgaris* (*D.v.*). Os ácidos aminados idênticos encontram-se circundados por traços mais espessos.

Da análise da Figura VIII.5 conclui-se que as proteínas isoladas das bactérias pertencentes ao género *Desulfomicrobium* possuem praticamente 100% de homologia das suas sequências N-terminal, revelando que se tratam de proteínas homólogas.

VIII.6. Determinação do conteúdo em ferro

Por espectroscopia de Emissão de Plasma, verificou-se que o ferro era o único metal presente na proteína P₅₇₂. A determinação do teor em ferro foi efectuada seguindo o método descrito por Fisher e Price, usando o reagente TPTZ.²² O valor do coeficiente de extinção molar (ϵ , M⁻¹cm⁻¹) usado na determinação da proteína foi calculado com base na concentração determinada pela composição de ácidos aminados. Verifica-se que cada molécula de P₅₇₂ possui 11 ± 0.7 átomos de ferro.

VIII.7. Determinação do conteúdo em sirohemo

O conteúdo em sirohemo foi analisado segundo o método de Siegel.²³ O sirohemo foi extraído com acetona/HCl e subsequentemente complexado com piridina. A um volume de P₅₇₂ (100 μ l) foram adicionados nove volumes de acetona/HCl (15 mM de HCl em acetona, mantida a -20 °C) e agitou-se vigorosamente. A solução foi mantida a 0 °C durante 5 minutos e seguidamente centrifugada a uma velocidade elevada para remover a proteína precipitada. Com o objectivo de estabilizar o cromóforo extraído, a cada volume de sobrenadante foram adicionados 0.5 volumes de piridina. Centrifugou-se a solução obtida e traçou-se o espectro de visível do sobrenadante. Procedeu-se à quantificação do sirohemo usando o coeficiente de extinção molar do complexo piridina-hemocromo, $\epsilon_{557-700} = 1.57 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹.²⁴ O espectro resultante, típico de complexos sirohemo-piridina, apresenta picos de absorção máxima a 586 e 376 nm (Figura VIII.6). A banda larga entre 430 e 480 nm e ainda a cor amarelada da solução indicam a presença de grupos flavínicos como co-factor. A concentração de sirohemo calculada é igual a 2 ± 0.3 moles de sirohemo por molécula de P₅₇₂.

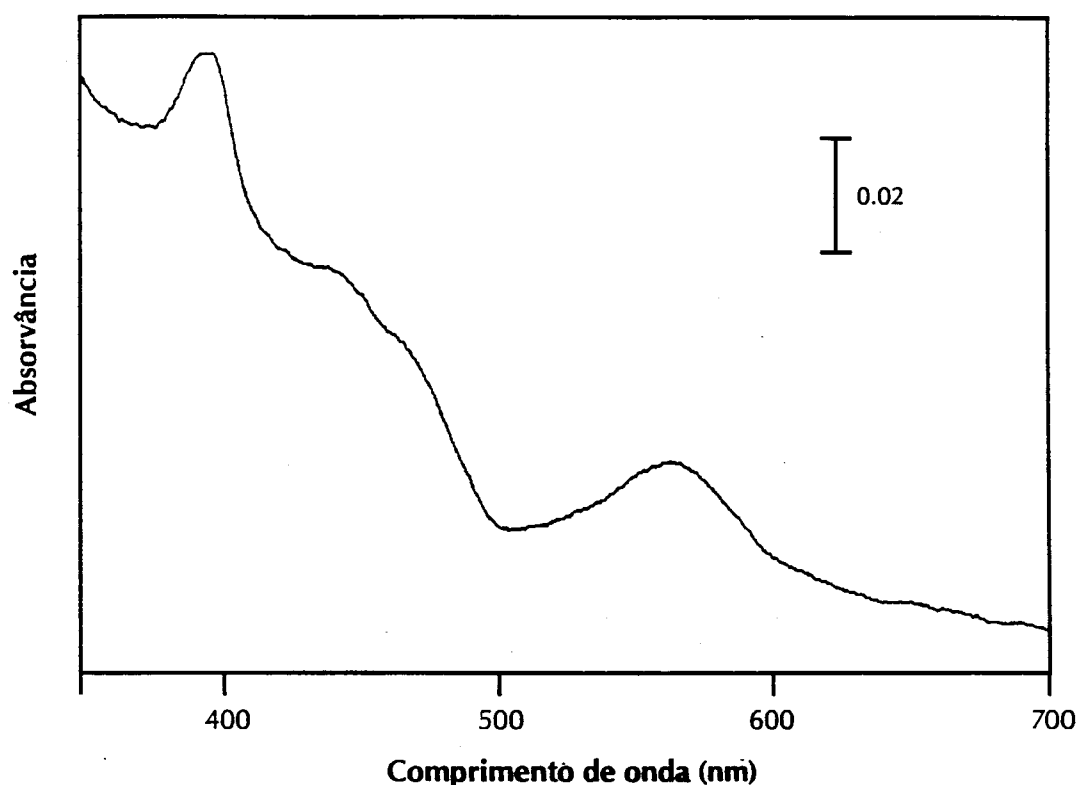


Figura VIII.6. Espectro de visível do complexo sirohemopiridina extraído com acetona/HCl da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus*.

VIII.8. Determinação do conteúdo em flavina

O conteúdo em flavina foi determinado segundo o método descrito por Rao e colaboradores em 1967.²⁵ O espectro de visível de uma amostra da proteína P₅₇₂ (1.2 μ M) foi traçado contra água destilada, tendo sido registado o valor da absorvância a 450 nm. Seguidamente, procedeu-se à redução da mostra com ditionito de sódio e, novamente foi lida a absorvância. A resultante diferença na absorvância a 450 nm, corresponde a 4 ± 0.2 moles de flavinas por molécula de proteína. A sua quantificação efectuou-se usando um coeficiente de extinção molar, a 450 nm, igual a $10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Por analogia com a proteína isolada de *Dsm. desulfuricans* Norway 4, sugere-se que as unidades flavínicas presentes sejam do tipo FMN.

VIII.9. Espectroscopia de UV/visível

O espectro de UV/visível do P₅₇₂ oxidado, apresentado na Figura VIII.7, exibe picos de absorção máxima a 572, 390 e 278 nm e uma banda pronunciada entre 475 e 450 nm. O espectro obtido é muito semelhante ao de outras proteínas que contêm grupos sirohemio.^{7,12,26}

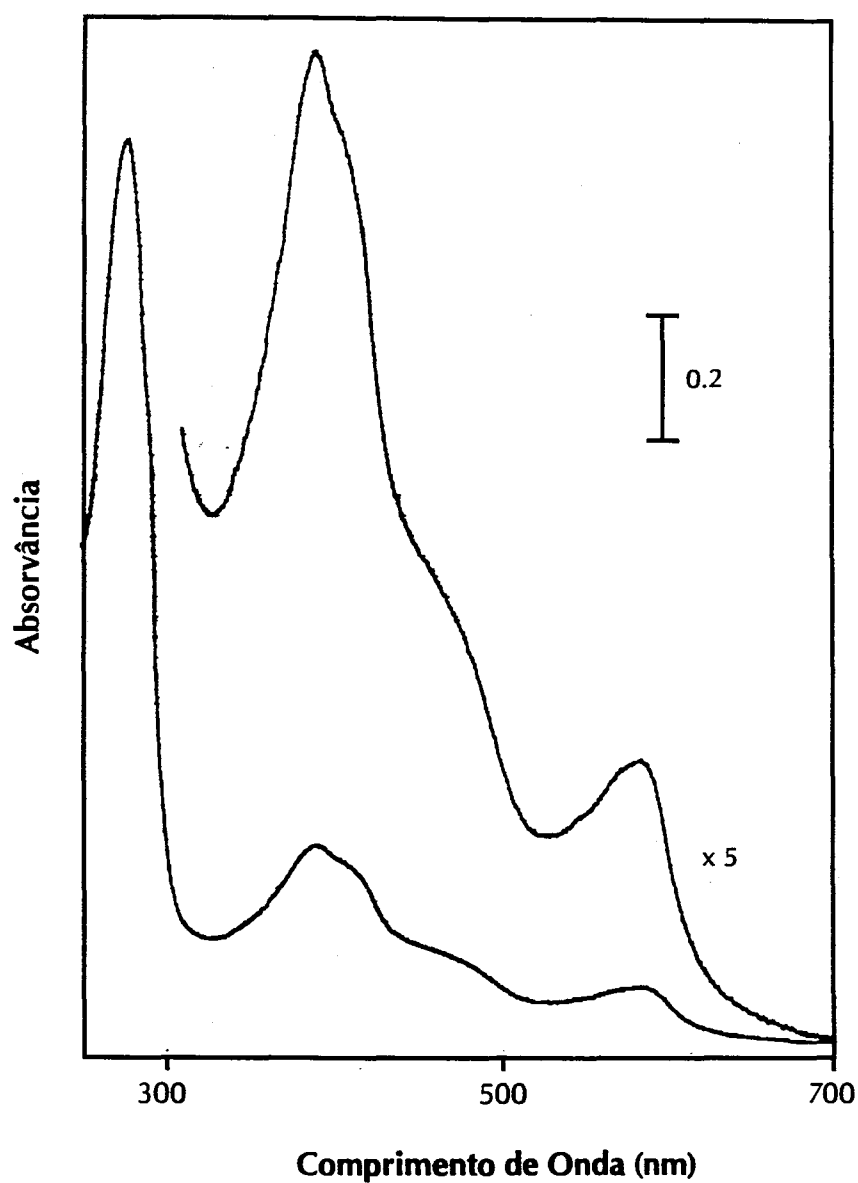


Figura VIII.7. Espectro de UV/visível da proteína P₅₇₂ isolada de *Dsm. baculatus* 9974, na forma nativa.

A ausência de qualquer banda na região abaixo de 700 nm indica que o átomo de ferro do sirohemo não se encontra num estado de spin alto ($S=5/2$), tal como descrito por Siegel e colaboradores para a redutase do sulfito de *E. coli*. A banda observada a 450-475 nm é devida à presença de grupos flavínicos.

Os coeficientes de extinção molar medidos a 572 e 390 nm são iguais a 68200 e 184000 $M^{-1}cm^{-1}$, respectivamente, tendo sido calculados com base numa concentração de proteína determinada pelo método de Lowry e por composição de ácidos aminados.

A redução química da proteína P_{572} , com ditionito de sódio, origina um decréscimo da absorção a 572 nm e o desaparecimento da banda larga a 450-475 nm que é devido à redução das flavinas. Paralelamente, é possível observar um novo pico de absorção a 593 nm, como se pode observar na Figura VIII.8.

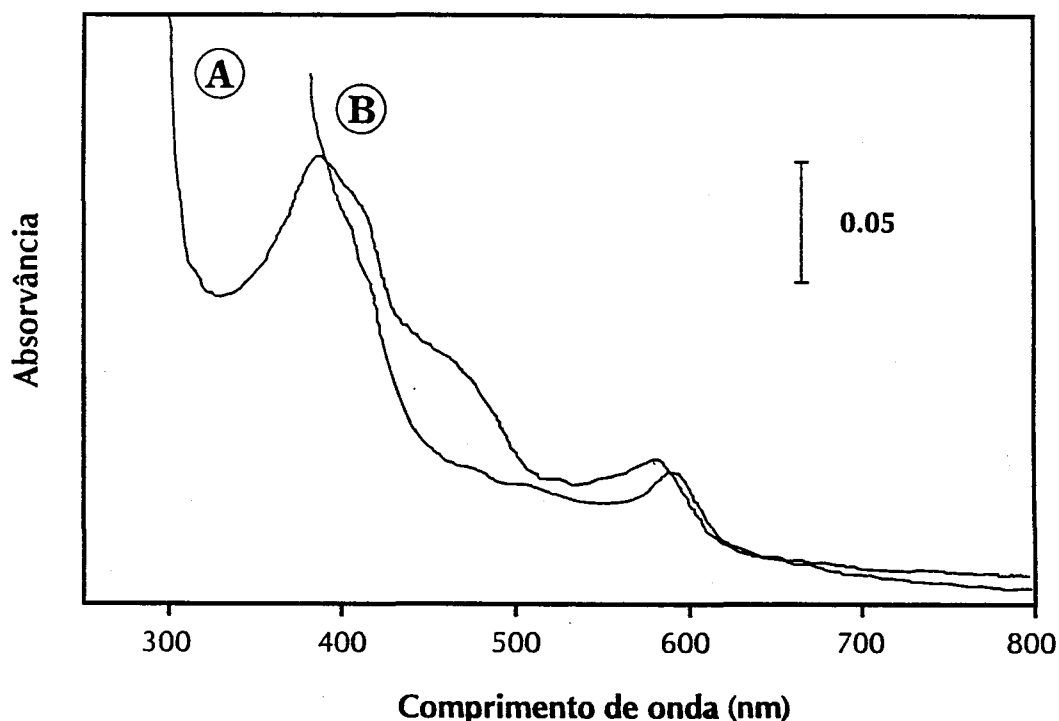


Figura VIII.8. Espectro de UV/visível da proteína P_{572} isolada de *Dsm. baculatus* 9974, na forma reduzida. (A) proteína nativa e (B) proteína reduzida com ditionito de sódio.

A adição de NADPH (ou NADH) a uma amostra de proteína não originou qualquer alteração no espectro de visível. Este facto é interessante, uma vez que todas as redutases do sulfito que contêm flavinas usam, geralmente, o NADPH como dador de electrões, tal como a redutase de *E. coli*.¹²

VIII.10. Espectroscopia de RPE

O espectro de RPE da proteína P₅₇₂ na forma nativa (Figura VIII.9) é constituído por um conjunto de ressonâncias a campo baixo, à volta de $g=6.0$, e um sinal radicalar a $g=2.009$, atribuído à presença de uma pequena fracção de flavinas no estado semi-reduzido. As ressonâncias com valores de g iguais a 6.24, 5.19 e 1.96 são características de iões férricos de spin alto dos grupos sirohemo, tendo sido detectadas na redutase do sulfito de *E. coli*.^{12,13} No espectro a 12 K (Figura VIII.9B) podem-se ainda observar dois picos muito alargados a g iguais a 2.66 e 2.44, que poderão dever-se a uma fracção de moléculas com o ião do grupo sirohemo no estado ferrico de spin baixo. Contrariamente à redutase assimilativa de *D. vulgaris*, no espectro de RPE da proteína P₅₇₂ na forma nativa não predominam as ressonâncias típicas de iões férricos de spin baixo ($g=2.44$, 2.36 e 1.77, $S=1/2$). No entanto, o espectro global é muito semelhante ao da proteína análoga de *E. coli*.^{12,15}

A redução da proteína P₅₇₂ com ditionito de sódio (0.1 M ditionito em 0.1 M Tris-HCl pH ~9.0) numa atmosfera anaeróbica provoca o desaparecimento total da espécie a $g \sim 6.0$ (Figura VIII.9C). A não detecção de novos sinais de RPE associados aos agregados ferro-enxofre é explicada em termos dos valores de potencial de oxidação-redução destes centros, que sendo muito negativos, dificultam a redução total da proteína nas condições referidas.

Estudos preliminares de Mössbauer indicam que na forma nativa, a maioria das moléculas possuem o átomo de ferro do grupo sirohemo no estado de spin baixo e a existência de agregados [4Fe-4S] na forma oxidada ($S=0$).

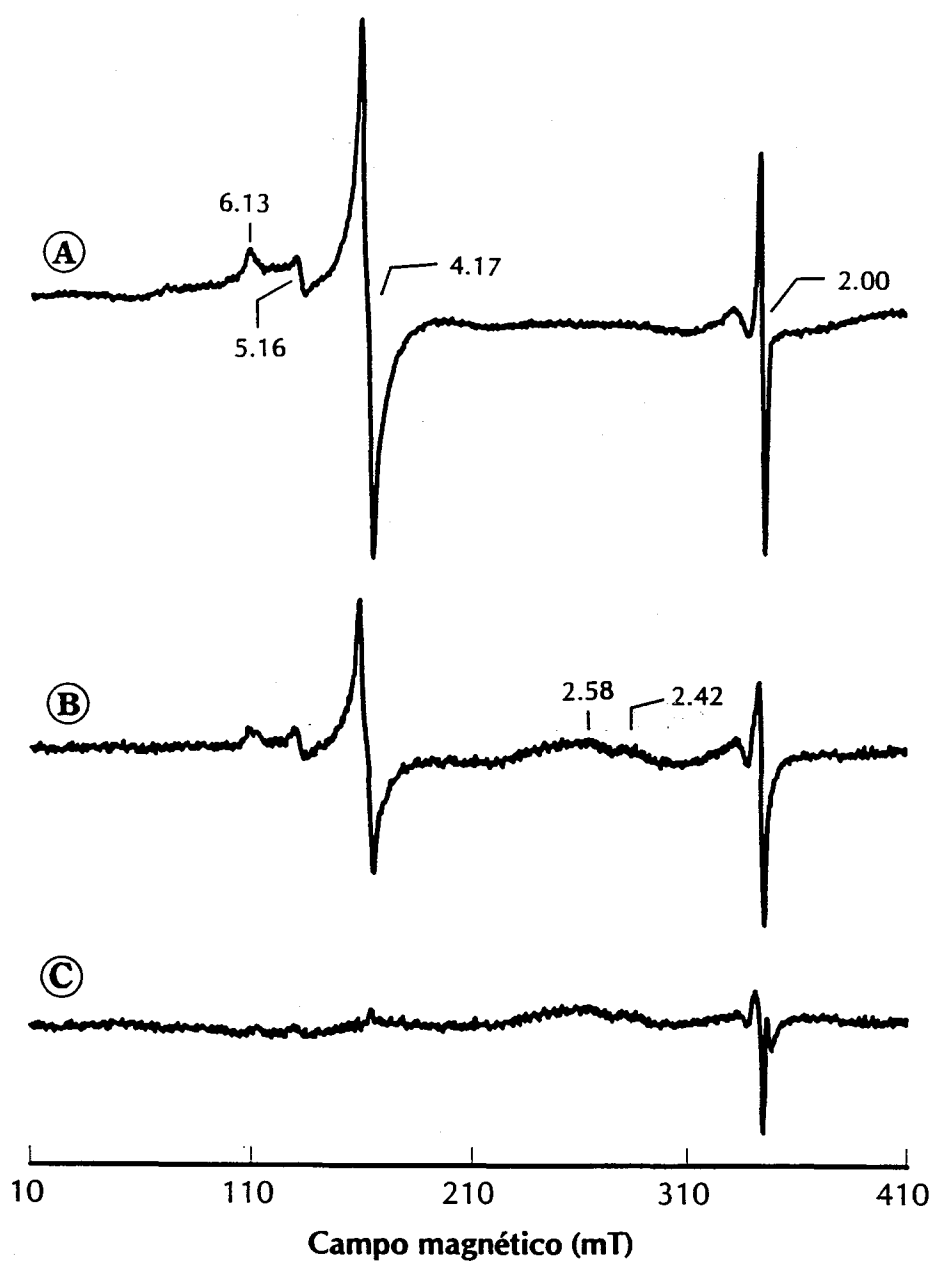


Figura VIII.9. Espectros de RPE da proteína P₅₇₂ de *Dsm. baculatus*. (A), proteína na forma nativa a 4.5 K; (B), amostra anterior a 12 K e (C), proteína reduzida com ditionito de sódio a 12 K. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.45 GHz; potência da micro-onda, 2 mW; amplitude da modulação, 1 mT; ganho, 1.25×10^5 .

VIII.11. Discussão

Os resultados apresentados evidenciam a ocorrência de uma nova redutase do sulfito na bactéria *Desulfomicrobium baculatus* DSM 9974, tal como acontece em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. A presença de duas redutases do sulfito no mesmo organismo e o facto da bactéria produzir grandes quantidades de sulfureto quando crescida em meio contendo lactato e sulfato, aponta para a possibilidade da proteína P₅₇₂ ser do tipo assimilativa. Contudo, esta proteína apresenta propriedades fisico-químicas distintas das restantes enzimas da mesma classe, como se pode verificar nas Tabelas VIII.2 e VIII.3.

A proteína P₅₇₂ (~150 kDa) é uma proteína complexa que contém 4 unidades FMN, 2 grupos sirohemo e 2 agregados [4Fe-4S]. O espectro de UV/visível da proteína, com picos de absorção máxima a 572, 390 e 278, é idêntico ao da proteína isolada de *Dsm. desulfuricans* Norway 4.⁷ A ausência de picos na região entre 800 e 600 nm, sugere a ocorrência de grupos sirohemo com átomos de ferro no estado de spin baixo, o que é confirmado pelos dados da espectroscopia de Mössbauer.

O espectro de RPE da proteína na forma nativa exhibe um conjunto de ressonâncias características de iões férricos de spin alto, que se sabe representar uma espécie minoritária (dados provenientes da espectroscopia de Mössbauer). Nas condições experimentais descritas não foi possível obter a redução total da proteína e, por isso, não foram detectados quaisquer sinais de RPE associados aos agregados ferro-enxofre. O facto de não ter sido observado um sinal de RPE típico de iões férricos de spin baixo poderá dever-se, por um lado, à baixa concentração da amostra usada dificultando a detecção de tais espécies, ou por outro lado, à possibilidade da amostra se encontrar parcialmente reduzida. No caso da redutase do sulfito de *E. coli*, o sinal de RPE referente ao ião férrico de spin baixo ($g=2.39, 2.31$ e 1.73) só foi detectado após incubação da amostra nativa com sulfito, CO ou CN⁻.^{12,27} A redução total da enzima envolve dois passos sequenciais de um electrão. O primeiro electrão reduz o ião férrico de spin alto ($S=5/2$) ao estado ferroso ($S=1$ ou 2), enquanto que o segundo electrão é necessário para a redução mono-electrónica do agregado [4Fe-4S], de acordo com o esquema da Figura VIII.10.

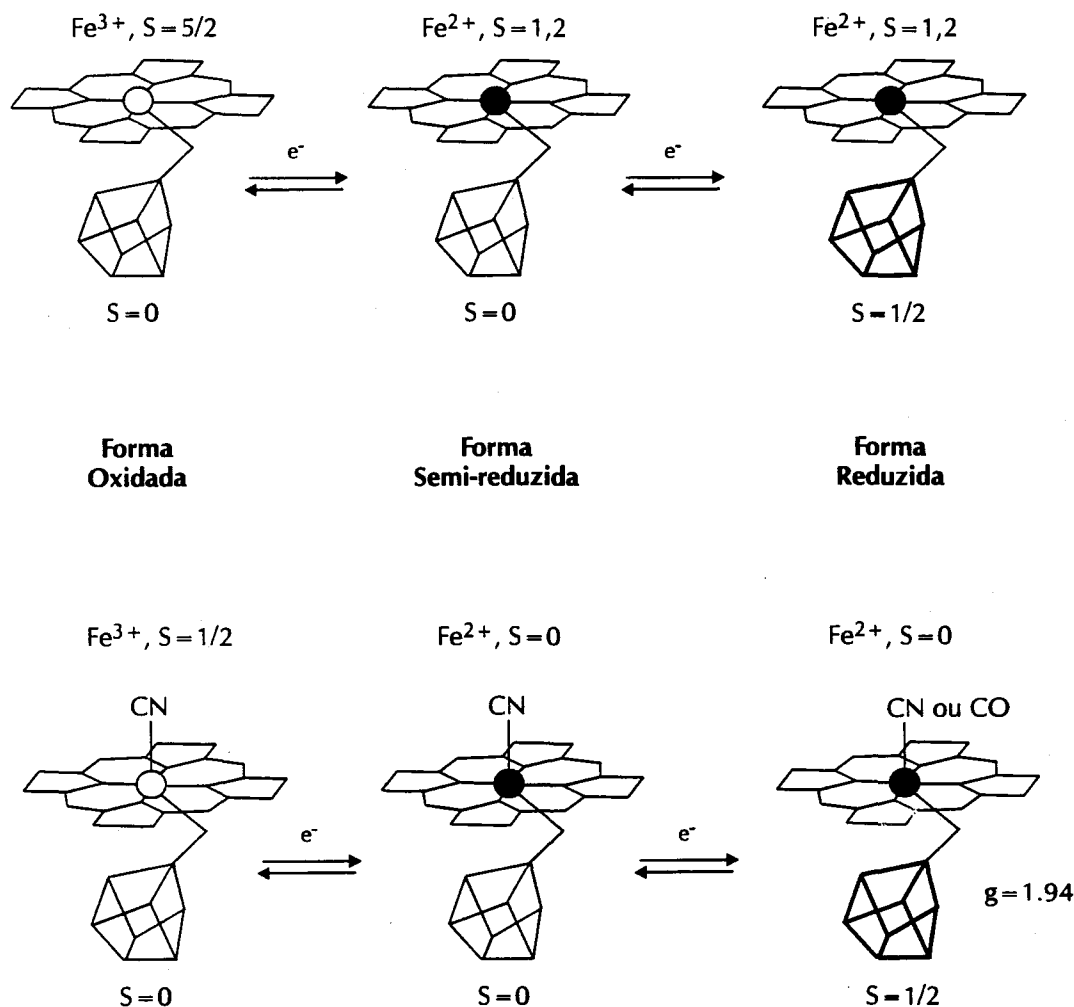


Figura VIII.10. Representação esquemática dos diferentes estados de oxidação da subunidade HP da redutase do sulfeto de *E. coli* (adaptado das referências 30 e 28).

A aplicação de um conjunto de técnicas espectroscópicas (espectroscopias de RPE, Mössbauer, ENDOR e cristalografia de Raios-X) à subunidade HP da redutase (subunidade β que contém as unidades sirohemo e os agregados $[4\text{Fe-4S}]$) de *E. coli* permitiu chegar à conclusão que dois agregados $[4\text{Fe-4S}]$ se encontram magneticamente acoplados aos dois grupos sirohemo, através de um ligando em ponte, que se pensa ser um grupo $-\text{SH}$ de um resíduo de cisteína.^{12,27,29,30,31} A Figura VIII.11 mostra o modelo esquemático do centro activo da subunidade HP da redutase de *E. coli*.

Como anteriormente referido, da bactéria *Dsm. baculatus* DSM 9974 tinha já sido isolada e caracterizada uma redutase do sulfito dissimilativa (denominada desulforubidina) que apresenta propriedades físico-químicas muito diferentes (ver capítulos I e II). A ocorrência de uma segunda redutase do sulfito (do tipo assimilativa) neste organismo, e nas bactérias *Dsm. desulfuricans* Norway 4 e *D. vulgaris* Hildenborough, poderá constituir uma indicação da existência de redutases do sulfito "assimilativas" em todos (ou pelo menos em parte) os organismos redutores de sulfato. A presença de tal redutase do sulfito poderá dever-se ao facto de ser necessária uma segunda via (com uma regulação metabólica independente) para a assimilação do sulfureto produzido pela redução dissimilativa do sulfato, através da redutase do sulfito dissimilativa.

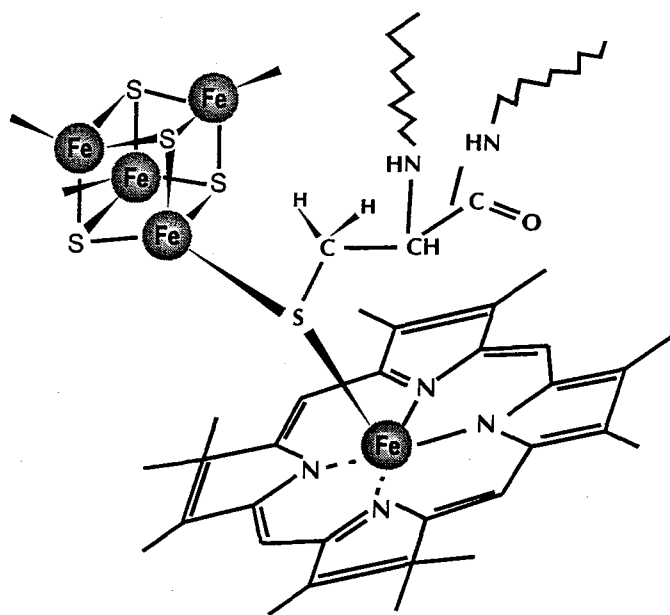


Figura VIII.11. Modelo esquemático do centro activo da subunidade HP da redutase do sulfito de *E. coli*. Assumiu-se que o ligando que estabelece a ponte sirohemo-[4Fe-4S] é um resíduo de cisteína. As distâncias representadas não estão à escala (adaptado das referências 4 e 32).

Tabela VIII.2

Caracterização bioquímica de algumas redutases do sulfito "assimilativas"

Organismo	Massa Molecular (kDa)	Subunidades (kDa)	Teor em Flavinas	Teor em Sirohemo	Agregados [4Fe-4S]	Ref.
<i>Dsm. baculatus</i> DSM 9974	151.0	α_4 45.4	4 x FMN	2	2	★
<i>Dsm. desulfuricans</i> Norway 4	150.0	α_4 42.6	2 x FMN	2	2	7
<i>Escherichia coli</i>	670.0	$\alpha_8\beta_4$ (59/54.6)	4 x FMN 4 x FAD	4	4	4,33
<i>Espinafre</i>	138.0	α_2 (69)	0	2	2	34,35
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	27.0	α	0	1	1	1,36
<i>Methanosarcina barkeri</i>	23.0	α	0	1	1	2,3
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	23,5	α	0	1	1	3
<i>Levedura</i>	350.0	n.d.	1 x FMN 1 x FAD	n.d.	5 x Fe 3 x S	5,6

★ - dados deste trabalho

① - Uma unidade, U, corresponde a 1 $\mu\text{mole MV}^{1+}$ consumido/min.② - Uma unidade, U, corresponde a 1 $\mu\text{mole H}_2$ consumido/min.

n.d. - não determinado

Tabela VIII.3

Caracterização espectroscópica de algumas redutases do sulfito "assimilativas"
na forma nativa

Organismo	Espectroscopia de visível	Espectroscopia de RPE			Ref.
	Máximos de Absorção (nm)	Valores de g	Estado de Spin	Concentração em Spins/hemo	
<i>Dsm. baculatus</i> DSM 9974	572, 390	6.42, 5.19, 1.96	5/2 spin alto	espécie menor	★
<i>Dsm. desulfuricans</i> Norway 4	572, 390	2.71, 2.36, 2.09	1/2 spin baixo	n.d.	7
<i>Escherichia coli</i> ①	714, 591, 386	6.63, 5.25, 1.97	5/2 spin alto	0.96	33,12
<i>Espinafre</i>	712, 587, 384	6.43, 5.46, 1.99	5/2 spin alto	0.91	5,34,35
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	590, 545, 400	2.44, 2.36, 1.77	1/2 spin baixo	0.80	1,15
<i>Methanosarcina barkeri</i>	590, 545, 395	2.40, 3.30, 1.88	1/2 spin baixo	0.94	2,3
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	587, 540, 401	2.44,2.33,1.81	1/2 spin baixo	1.0	3
<i>Levedura</i>	587, 386	n.d.	5/2 spin alto	n.d.	5,6
<i>Aspergillus nidulans</i>	585, 453, 384	n.d.	5/2 spin alto	n.d.	5

★ - dados deste trabalho

① - Os dados apresentados referem-se à componente HP da redutase do sulfito de *E. coli*.

n.d. - não determinado.

VIII.12. Bibliografia

1. Lee, J.P., LeGall, J., e Peck, H.D., Jr. 1973. *J. Bacteriol.* **115**, 529-542.
2. Moura, J.J.G., Moura, I., Santos, H., Xavier, A.V., Scanderllari, M., e LeGall, J. 1982. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 1002-1009.
3. Moura, I., Moura, J.J.G., Xavier, A.V., Fauque, G., Peck, H.D., Jr, e LeGall, J. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 1032-1041.
4. McRee, D.E., Richardson, D.C., Richardson, J.S., e Siegel, L.M. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**, 10277-10281.
5. Yoshimoto, A., e Sato, R. 1967. *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 576-588.
6. Yoshimoto, A., Nakamura, T., e Sato, R. 1967. *J. Biochem. Tokio* **62**, 756-766.
7. Kang, L. 1986. Tese de Doutorado Universidade da Georgia, Athens, USA.
8. Moura, I., LeGall, J., Lino, A.R., Peck, H.D., Jr, Fauque, G., Xavier, A.X., DerVartanian, D.V., Moura, J.J.G., e Huynh, B.H. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1075-1082.
9. Lee, J.-P., Yi, C.-S., e Peck, H.D., Jr. 1973. *J. Bacteriol.* **115**, 453-455.
10. Arendsen, A.F., Verhagen, M.F.J.M., Wolbert, R.B.G., Pierik, A.J., Stams, A.J.M., Jetten, M.S.M., e Hagen, W.R. 1993. *Biochem.* **32**, 10323-10330.
11. Pereira, A.S., Franco, R., Feio, M.J., Pinto, C., Lampreia, J., Reis, M.A., Beech, I., Moura, I., Lino, A.R., e Moura, J.J.G. 1994. *J. Bacteriol.* Submetido para publicação.
12. Siegel, L.M., Rueger, D.C., Barber, M.J., Krueger, R.J., Orme-Johnson, N.R, e Orme-Johnson, W.H. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**, 6343-6350.
13. Stolzenberg, A.M., Strauss, S., e Holm, R.H. 1981. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 4763-4778.
14. Drake, H.L., e Akagi J.M. 1976. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **71**, 1214-1219
15. Huynh, B.H., Kang, L., DerVartanian, D.V., Peck, H.D., Jr., e LeGall, J. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**, 15373-15376.

16. Biebl, H., e Pfennig, N. *Arch. Microbiol.* **112**, 115-117.
17. Genthner, B.R.S., Mundfrom, G., e Devereux, R. *Arch. Microbiol.* **161**, 215-219.
18. LeGall, J., Mazza, G., e Dragoni. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 385-387.
19. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* **227**, 680-685.
20. Moore, S., e Stein, W.H. 1963. *Methods in Enzymology* **6**, 819-831.
21. Hirs, C.H.W. 1986. *Methods in Enzymology* **11**, 167-199.
22. Fisher, D.S., e Price, D.C. 1964. *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
23. Siegel, L.M., Murphy, M.J., Kamin, H. 1978. *Methods in Enzymology* **52**, 436-447.
24. Rao, N.A., Felton, S.P., e Huennekens, F.M. 1967. *Methods in Enzymology* **10**, 4394-499.
25. Moura, I., e Lino, A.R. 1994. *Methods in Enzymology* **243**, em impressão.
26. Janick, P., e Siegel, L.M. 1982. *Biochem.* **21**, 3538-3547.
27. Ostrowski, J., Wu, J.-Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M., e Kredich, M. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**, 15726-15735.
28. Christner, J.A., Münk, E., Janick, P.A., e Siegel, L.M. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 2098-2101.
29. Christner, J.A., Münk, E., Janick, P.A., e Siegel, L.M. 1983. *J. Biol. Chem.* **258**, 11147-11156.
30. Christner, J.A., Janick, P.A., Siegel, L.M., e Münk, E., 1983. *J. Biol. Chem.* **258**, 11157-11164.
31. Cline, J.F., Janick, P.A., Siegel, L.M., e Hoffman, B.M. 1985. *Biochem.* **24**, 7942-7947.
32. Siegel, L.M., e Davis, P.S. 1974. *J. Biol. Chem.* **249**, 1586-1787.
33. Asada, K., Tamura, G., e Bandurski, R.S. 1969. *J. Biol. Chem.* **244**, 4905-4915.
34. Asada, K. 1967. *J. Biol. Chem.* **242**, 3646-3654.

35. Holm, R.H., Ciurli, S., e Weigel, J.A. 1990. *In* "Progress in Inorganic Chemistry: Bionorganic Chemistry", Ed. S.J. Lippard, Vol. 38, págs. 2-64.

APÊNDICE A

MÉTODOS ANALÍTICOS

Apêndice A. Métodos Analíticos.

1. Meios de crescimento e preparação do extracto celular	301
2. Determinação da proteína. Método de Lowry.	302
3. Determinação do conteúdo em ferro. Método do TPTZ.	303
4. Determinação do conteúdo em flavina	305
5. Electroforese em gel de poliacrilamida	306
5.1. Electroforese em condições desnaturantes	306
5.2. Electroforese em condições não desnaturantes	311
5.3. Transferência electroforética para membranas de PVDF	311
6. Hidrólise ácida e oxidação perfórmica	318
7. Ensaio de actividade da redutase do APS	320
7.1. Ferricianeto como aceitador de electrões	320
7.2. Citocromo c de cavalo como aceitador de electrões	321
8. Titulações potenciométricas	323
8.1. Titulações acopladas à espectroscopia de UV/visível	323
8.2. Titulações acopladas à espectroscopia de RPE	324
8.3. Análise das curvas de titulação	324
9. Espectrofotómetro de UV/visível	327
10. Espectrómetro de RPE	327
11. Espectrómetro de Mössbauer	327
12. Bibliografia	328

A.1. Meios de crescimento e preparação do extracto celular.

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC tem a capacidade de crescer, quer em meio de sulfato, obtendo a energia necessária ao seu desenvolvimento através da redução dissimilativa do sulfato, quer na presença de nitrato levando a cabo o processo de redução dissimilativa do nitrato. Para o crescimento e obtenção da massa celular deste microrganismo, foi usado um meio contendo lactato e nitrato, descrito por Liu e Peck, com o objectivo de se obter um maior rendimento celular e também para promover a produção das enzimas envolvidas na redução do nitrato (como por exemplo, as redutases do nitrato e do nitrito).¹ As células foram crescidas a pH 7.5 e a 37 °C, num volume total de 400 litros. Nestas condições, obtêm-se cerca de 800 g de células por 400 litros de meio.

O enriquecimento isotópico de *D. desulfuricans*, foi efectuando crescendo os organismos em meio ao qual foi adicionado 0.5 mg/ml de ⁵⁷Fe (~95 % de enriquecimento).

A bactérias *Thiobacillus denitrificans* ATCC 23642 foram crescida num meio adaptado do descrito por Baldensperger e Garcia.²

As células de *Desulfovibrio desulfuricans* subespécie *desulfuricans* New Jersey NCIMB 8313 e de *Desulfomicrobium baculatus* DMS 9974 foram crescidas em meio com lactato que continha sulfato como aceitador final de electrões, a 37 °C, de acordo com o descrito por LeGall e colaboradores.³

A células assim crescidas são recolhidas após centrifugação e ressuspendidas em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 7.6. Para a obtenção das proteínas solúveis de *D. desulfuricans* e *T. denitrificans*, procedeu-se à ruptura da parede e da membrana celular, utilizando-se uma prensa do tipo "French Press" com uma pressão máxima aplicada de 9000 p.s.i.. Ao extracto obtido foram adicionadas algumas miligramas de DNase I e DNase II, com a finalidade de degradar o DNA e RNA presentes, diminuindo assim a viscosidade. Seguidamente o extracto é centrifugado a 19000 x g durante 30 minutos e posteriormente ultracentrifugado a 180000 x g aproximadamente 90 minutos, a 5 °C. O sobrenadante é recolhido, constituindo o extracto celular. Nele estão presentes todas as proteínas periplasmáticas e

citoplasmáticas, que serão separadas posteriormente pela aplicação de técnicas cromatográficas.

A.2. Determinação da proteína. Método de Lowry.

A concentração exacta das proteínas foi calculada segundo o método descrito por Lowry e colaboradores.⁴ O método baseia-se na formação de complexos coloridos, em solução alcalina, entre os iões cobre (II) e os grupos $-C=O$ e $-NH_2$ dos resíduos de ácidos aminados das cadeias polipeptídicas, permitindo a sua quantificação espectrofotométrica. Na mistura reaccional é, ainda usado um reagente (reagente de Folin) que, interagindo especificamente com os resíduos de tirosina, triptofano e cisteína, produz um complexo que apresenta uma intensa cor azulada, aumentando a sensibilidade do método e permitindo, portanto, o uso de menores quantidades de proteína (entre 0 e 100 μg).

As soluções usadas na determinação da proteína pelo método de Lowry vêm descritas na Tabela A.1.

Às amostras de proteína a determinar (5 a 100 μg em 0.1 ml) é adicionado 1 ml da solução C, deixando-se incubar a mistura, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente adicionam-se 0.1ml da solução D, agita-se imediatamente e deixa-se incubar. Após 30 minutos de incubação é lida a absorvância a 750, 680 e 580 nm.

Para a determinação da recta de calibração, usou-se uma mistura de padrões de albumina e globulina (*Sigma Diagnostics Protein Standard*) com uma concentração total de 8.0 g/dl (5.0 g/dl de albumina e 3.0 g/dl de globulina). A recta é construída representando graficamente as absorvâncias lidas, após correcção em relação ao branco (em que se substitui a proteína pelo mesmo volume de água) em função da quantidade de proteína padrão em cada amostra. O gráfico resultante é apresentado na Figura A.1.

Tabela A.1

Soluções "Stock" para a determinação da proteína pelo método de Lowry

Solução	Reagentes	Preparação
A	2% Na_2CO_3 em 0.1 N NaOH	2 g Na_2CO_3 em 100 ml de 0.1 N NaOH
B1	1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de H_2O
B2	2% Tartarato duplo de sódio/potássio	2 g Tartarato de Na/K em 100 ml de H_2O
B	Mistura das soluções B1 e B2 numa razão 1:1★	—
C	Solução alcalina de cobre★	Misturar as soluções A e B numa razão 50:1
D	Reagente Folin diluído 1:2★	—

★ Preparar de fresco.

A.3. Determinação do conteúdo em ferro. Método do TPTZ.

A concentração de ferro presente nas proteínas descritas nesta Tese foi determinada pelo método do TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s-triazina).⁵ Este método baseia-se na reacção do TPTZ com os átomos de ferro ferroso da amostra, produzindo-se um complexo, que absorve na região do visível. Para uma quantificação correcta, é necessário extrair, primeiramente, todo o ferro da amostra e depois reduzi-lo, impedindo deste modo a não contabilização do ferro no estado férrico. Para minimizar a interferência de ferro exógeno usam-se tubos de plástico e água bi-destilada.

As soluções usadas no doseamento do ferro estão listadas na Tabela A.2.

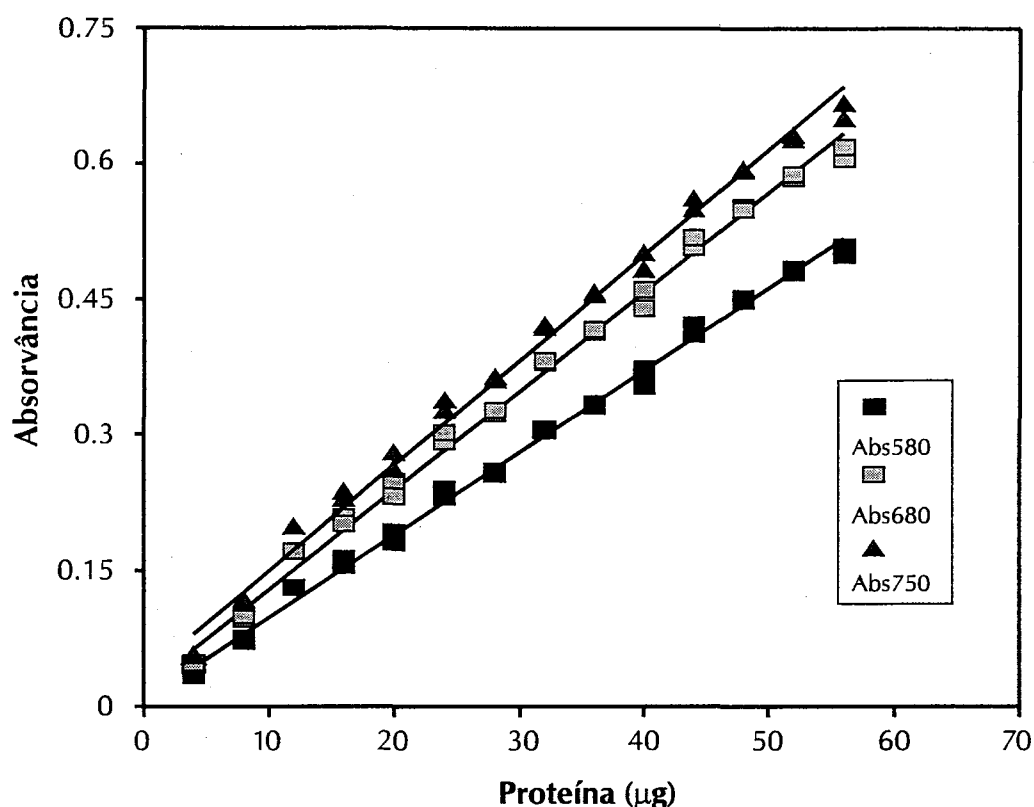


Figura A.1. Recta de calibração para a determinação da proteína pelo método de Lowry.

Preparam-se as amostras de proteína (2 a 25 nmol de ferro) num volume de 400 µl, e adicionam-se 50 µl de ácido clorídrico, para a extracção do ferro. Depois de homogeneizada a mistura é incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, a proteína é precipitada por adição de 50 µl de TCA e removida por centrifugação a 10000 rpm, durante cerca de 5 minutos (*Microfuge 12, Beckman*). Transferem-se 400 µl do sobrenadante para microtubos novos, aos quais se adicionam 100 µl de acetato de amónia e 40 µl de cloreto de hidroxilamina. Agita-se a mistura e junta-se, finalmente, 40 µl de TPTZ. A mistura reaccional, depois de agitada num vortex, é mantida durante 10 minutos à temperatura ambiente. Se após a incubação as amostras não estiverem límpidas centrifugam-se, procedendo-se depois à leitura da absorvância a 593 nm. A recta de calibração para a determinação de ferro está representada graficamente na Figura A.2.

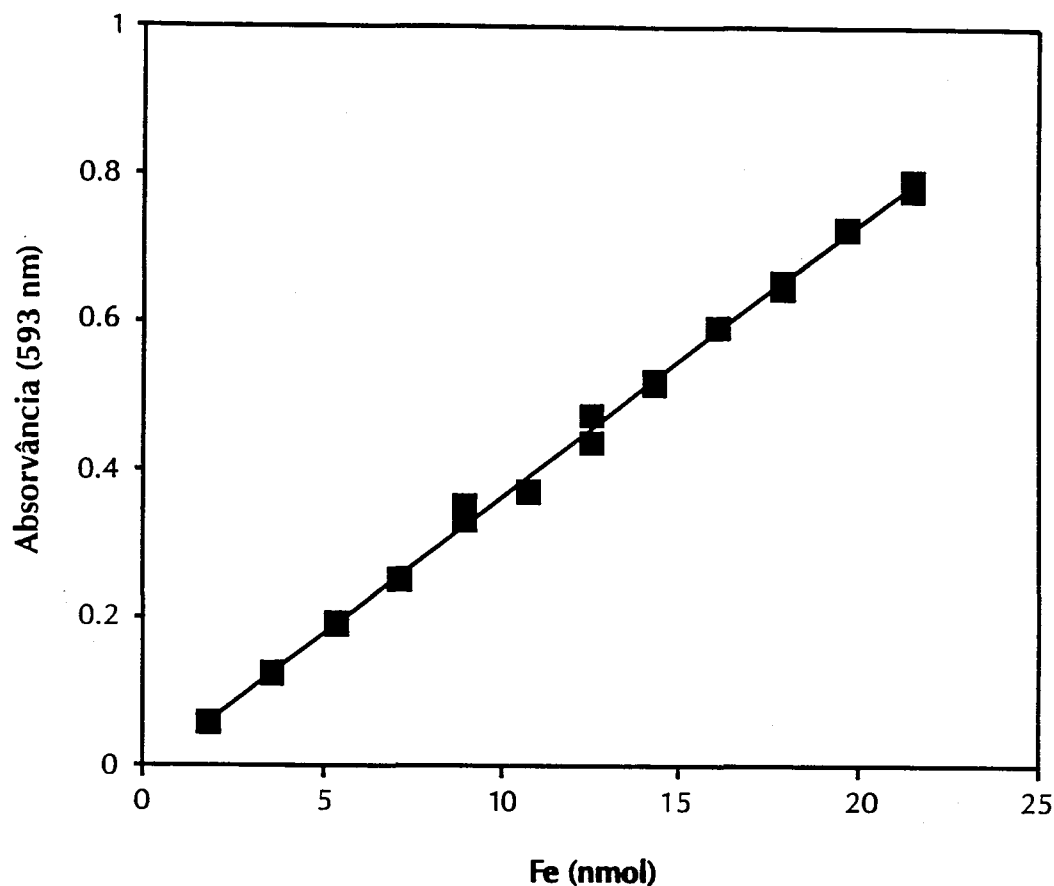


Figura A.2. Recta de calibração para a determinação do conteúdo em ferro pelo método do TPTZ.

A.4. Determinação do conteúdo em flavina.

Geralmente, o teor em flavina das flavoproteínas mencionadas neste trabalho foi determinado após solubilização das mesmas. A proteína é precipitada pela adição de 0.1 ml de TCA a 80%, a 0.9 ml de amostra e removida por centrifugação. Traça-se o espectro de visível do sobrenadante e calcula-se a concentração de flavina, usando um coeficiente de extinção molar a 441 nm, igual a $11300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tabela A.2

Soluções "Stock" para a determinação do ferro pelo método do TPTZ

Solução	Preparação
Ácido ascórbico a 10%	10 g em 100 ml de H ₂ O
Ácido clorídrico a 8 N	66.3 ml HCl a 37% em 33.7 ml de H ₂ O
Ácido tricloroacético (TCA) a 80%	40 g em 50 ml de H ₂ O
Acetato de amónia a 75%	75 g em 100 ml de H ₂ O
Cloreto de hidroxilamina a 10%	10 g em 100 ml de H ₂ O
TPTZ a 4 mM	64.4 mg em 50 ml de 0.04 N HCl

A.5. Electroforese em gel de poliacrilamida.

A.5.1. Electroforese em condições desnaturantes

Esta técnica permite a análise da composição das subunidades, quando existem, de uma proteína, bem como a determinação da sua massa molecular, por comparação com a mobilidade electroforética, no gel, de diferentes proteínas padrão.

A técnica consiste numa adaptação do método descrito por Laemmli, em que se usam concentrações fixas de acrilamida na presença de 0.1% de SDS.⁶ As soluções "stock" usadas vêm referenciadas na Tabela A.3. Os volumes necessários para a preparação do gel a diferentes concentrações de acrilamida são apresentados na Tabela A.3a, sendo apresentados os valores requeridos para a preparação de um gel com 16 x 18 cm, com 1.5 mm de espessura (tina da Pharmacia/LKB *LKB 2001 Vertical Electroforesis*) e, entre parêntesis, a um mini-gel com 7 x 10 cm, com 0.75 mm de espessura (tina da *Bio-Rad Mini-protean II Dual Slab Cell* - Mini Gel).

Em primeiro lugar é preparado o gel de resolução que é transferido para o interior das placas de electroforese, deixando cerca de 2.5 cm para o gel concentrador. Após a aplicação do gel de resolução, adicionam-se alguns mililitros de 1-butanol (ou água) no topo do gel, para obviar a formação de uma superfície irregular. Deixa-se polimerizar o gel à temperatura ambiente (30 a 45 minutos, para um mini-gel a 12.5% em acrilamida). Depois de totalmente polimerizado remove-se o 1-butanol e lava-se a superfície do gel de resolução com água (ou com um pouco de tampão do gel concentrador).

Finalmente transfere-se a mistura do gel concentrador, para o topo do gel de resolução (já polimerizado) e introduz-se o "pente" que formará os "poços" onde as amostras serão aplicadas. Deixa-se à temperatura ambiente durante a polimerização.

As amostras a aplicar deverão conter cerca de 20 µg de proteína num volume de 25 µl (3.5 a 5 µg em 10 µl). Adiciona-se igual volume de tampão (solução VII) e levam-se 2 minutos a 100 °C, para garantir a total desnaturação da proteína.

A massa molecular de uma proteína é determinada por comparação da sua mobilidade electroforética com a das proteínas padrão usadas. Usaram-se os conjuntos de padrões de electroforese de alta e baixa massa molecular, da *Pharmacia (Pharmacia Electrophoresis Calibration Kits HMW e LMW)*, que contêm as seguintes proteínas padrão: 1) *Kit de proteínas de baixa massa molecular (LMW)*, fosforilase b (94 kDa), albumina do soro bovino (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbónica (30 kDa), inibidor da tripsina de soja (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa); 2) *kit de proteínas de massa molecular elevada (HMW)*, tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), desidrogenase do lactato (140 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa).

As amostras de proteína e os padrões, preparados da mesma forma, são então aplicadas no gel. A separação dos diferentes componentes no gel é feita pela aplicação externa de uma voltagem constante de 170-200 (150) mV.

Tabela A.3

Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão do gel de resolução (I)	Tris Base, 1.5 M	18.17 g	pH=8.8-9.0
	SDS a 10% (Sol. IV)	4 ml	
	HCl	até pH 8.8	
	H ₂ O	até 100 ml	
Tampão do gel concentrador (II)	Tris Base, 0.5 M	6.06 g	pH=6.6-6.8
	SDS a 10% (Sol. IV)	4 ml	
	HCl	até pH 6.8	
	H ₂ O	até 100 ml	
Acrilamida (30%) /bisacrilamida (0.8%) (III)	Acrilamida	30 g	—
	Bisacrilamida	0.8 g	
	H ₂ O	até 100 ml	
SDS a 10% (IV)	SDS	10 g	—
	H ₂ O	até 100 ml	
Persulfato de amónia a 0.1% (V)	Persulfato de amónia	10 mg	Preparar antes de usar
	H ₂ O	até 10 ml	
Tampão de electroforese Tris-Glicina (VI)	Tris Base, 0.25 M	30.3 g	pH=8.3 Diluir 1:10 antes de usar
	Glicina, 1.92 M	144.1 g	
	SDS	10 g	
	H ₂ O	até 1000 ml	
Tampão para as amostras (VII)	Glicerol	2 ml	—
	β-mercaptoetanol	1 ml	
	SDS a 10% (Sol. IV)	5 ml	
	Solução II	2.5 ml	
	Azul de bromofenol	2 mg	
Solução corante (VIII)	Coomassie Blue R-250	1 g	—
	Ácido acético	15 ml	
	Metanol	90 ml	
	H ₂ O	200 ml	
Solução descorante (IX)	Ácido acético	75 ml	—
	Metanol	450 ml	
	H ₂ O	até 1000 ml	

As soluções I a III e VI deverão ser filtradas com papel de filtro *Whatman* nº 1 e guardadas em frascos de vidro escuro a 4 °C, excepto a solução IV que deverá ser mantida à temperatura ambiente.

Tabela A.3a

*Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida
na presença de 0.1% de SDS*

Solução "Stock"	Gel concentrador	Concentração final de acrilamida no gel de resolução (volumes em ml)				
		5%	7.5%	10%	12.5%	15%
I	—	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)	7.5 (1.25)
II	2.5 (0.5)	—	—	—	—	—
III	1.5 (0.3)	7.5 (1.25)	10.0 (1.67)	12.5 (2.1)	15.0 (2.5)	17.5 (2.92)
H ₂ O	3.0 (0.6)	10.5 (1.75)	8.0 (1.33)	5.5 (0.9)	3.0 (0.5)	0.5 (0.08)
Desarejar as misturas preparadas sob vácuo, durante 5 minutos						
V	2.0 (0.4)	4.5 (0.75)	4.5 (0.75)	4.5 (0.75)	4.5 (0.75)	4.5 (0.75)
TEMED (μl)	10.0 (2.0)	15.0 (2.5)	15.0 (2.5)	15.0 (2.5)	15.0 (2.5)	15.0 (2.5)

Para se obter uma maior gama de separação usam-se, normalmente géis de gradientes de concentração de acrilamida. São extremamente úteis para a separação e detecção de subunidades de uma proteína com massas moleculares muito diferentes, como é o caso das redutases dissimilativa do sulfito (50.0, 40.0 e 11.0 kDa, respectivamente). Neste trabalho, utilizaram-se géis de gradiente de concentração entre 5 e 20% em acrilamida. Na Tabela A.4 são apresentados os volumes necessários para a sua preparação.

Tabela A.4

Soluções necessárias para a preparação de um gel de gradiente entre 5 e 20% de acrilamida, na presença de 1 % de SDS

	Gel de electroforese (volumes em ml)	
	5%	20%
Acrilamida/bisacrilamida (30.0 : 0.8)	2.50	10.0
Tampão de Resolução (3M Tris-HCl, pH 8.8)	1.875	1.875
SDS (10%)	1.50	1.50
Persulfato de amónia (1.5%) ^①	0.35	0.35
Sucrose ^②	—	2.25 g
H ₂ O	8.775	0.025

① Persulfato de amónia a 1.5% (75 mg em 5 ml de H₂O);

② 2.25 g de sucrose ocupam um volume de 1.25 ml;

Após a adição dos respectivos volumes, as misturas devem ser desarejadas sob vácuo, durante 5 min. De seguida, adicionam-se 5.0 µl de TEMED, para iniciar a polimerização.

As soluções "Stock" são as mesmas que as do gel de poliacrilamida a uma concentração fixa, descritas na Tabela A.3, com a excepção do tampão do gel de resolução que, por uma questão de volumes, é preparado com o dobro da concentração.

A.5.2. Electroforese em condições não desnaturantes

A aplicação desta técnica tem como objectivo a separação dos diferentes componentes de uma mistura proteica em função das cargas e das suas massas. É vulgarmente usada na avaliação do grau de pureza de uma proteína. As condições não desnaturantes faz com que, durante a separação, sejam mantidas a estrutura e a conformação das proteínas, não afectando a actividade enzimática.

As soluções "stock" necessárias para a preparação de um gel em condições não desnaturantes são apresentadas na Tabela A.5. Os volumes de cada solução necessários para a preparação do mini-gel com 5 ml de volume total vêm indicados na Tabela A.5a.

As amostras a analisar (~5 µg em 10 µl), às quais foram adicionados 10 µl de tampão para amostras (solução G), são aplicadas no gel e separadas a voltagem constante de 120 mV, durante cerca de 1 hora. A visualização das bandas no gel, é feita com Coomassie Blue G-250 em ácido perclórico (Solução H).

A.5.3. Transferência electroforética para membranas de PVDF

A transferência electroforética ("*Blotting*") de proteínas (ou das subunidades de uma proteína), separadas por electroforese, para um suporte inerte, permitiu a determinação das sequências da região N-terminal das subunidades da redutase do APS de *D. desulfuricans* ATCC 27774.^{7,8} Após a separação das subunidades por electroforese em gel de poliacrilamida (12.5%), fez-se a sua transferência para membranas de difluoreto de polivinil - PVDF - (*Immobilon-PSQ* da Millipore ou *ProBlott™* da Bio-Rad), as quais foram sujeitas à degradação de Edman, *in situ*, num sequenciador automático *Applied Biosystem 477A*.

Esta técnica tem a vantagem de se poder remover, com elevado rendimento, as subunidades do gel, sem qualquer contaminante que possa interferir com os processos de sequenciação.

Tabela A.5

*Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida
em condições não desnaturantes*

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão do gel de resolução (A)	Tris Base, 3.0 M HCl H ₂ O	36.3 g até pH 8.8 até 100 ml	pH=8.8-9.0
Tampão do gel concentrador (B)	Tris Base, 0.5 M HCl H ₂ O	6.06 g até pH 6.8 até 100 ml	pH=6.6-6.8
Acrilamida (30%) /bisacrilamida (0.8%) (C)	Acrilamida Bisacrilamida H ₂ O	30 g 0.8 g até 100 ml	—
Persulfato de amónia (1.5%) (D)	Persulfato de amónia H ₂ O	0.15 mg 10 ml	Preparar antes de usar
Riboflavina a 0.004% (E)	Riboflavina H ₂ O	2 mg 50 ml	Preparar antes de usar
Tampão de electroforese Tris-Glicina (F)	Tris Base, 0.025 M Glicina, 0.192 M H ₂ O	3.03 g 14.41 g até 1000 ml	pH=8.3
Tampão para as amostras (G)	Glicerol Solução II Azul de Bromofenol	1.5 ml 3.5 ml 2 mg	—
Solução corante (H)	Coomassie Blue G-250 Ácido perclórico (60%) H ₂ O	40 mg 5.8 ml 100 ml	—

As soluções A a C e F deverão ser filtradas com papel de filtro *Whatman* n° 1, guardadas em frascos de vidro escuro e a 4 °C.

Tabela A.5a

*Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida
em condições não desnaturantes*

Solução "Stock"	Gel concentrador	Concentração final de acrilamida no gel de resolução (volumes em ml)				
		4%	7.5%	10%	12.5%	15%
A	—	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625
B	0.45	—	—	—	—	—
C	0.24	1.25	1.67	2.1	2.5	2.92
D	—	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
E	0.225	—	—	—	—	—
H ₂ O	0.885	2.875	2.455	2.025	1.625	1.445
TEMED (μl)	2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

A polimerização do gel concentrador é feita pela acção da luz.

Um dos problemas associados à sequenciação de componentes proteicos separados por electroforese consiste no bloqueio da região N-terminal, impossibilitando a ocorrência de degradação de Edman. Para minimizar este facto é importante o uso de reagentes de electroforese de elevada pureza e, no caso do SDS, é necessário proceder à sua recristalização. A purificação do SDS (*Merck*, >99%) foi efectuada seguindo a metodologia descrita por Hunkapiller e colaboradores.⁹ Ressuspenderam-se 100 g de SDS em 450 ml de etanol. A suspensão foi aquecida a 55 °C, mantendo a agitação. De seguida adicionaram-se entre 50 a 75 ml de água, previamente aquecida a 55 °C, até à total dissolução do SDS. Adicionaram-se 10 g de carvão activado. Após 10 minutos, filtrou-se a solução (filtro *Whatman* n° 5) para remover o carvão. A solução filtrada é incubada a 4 °C, durante 24 horas e depois transferida para -20 °C. Após 24 horas recolheu-se o SDS recristalizado, sob vácuo, num funil de vidro sinterizado e lavou-se com 800 ml de etanol a -20 °C. Todo o

processo foi repetido uma segunda vez sem, no entanto, adicionar carvão activado. Finalmente, o SDS repurificado foi seco, sob vácuo, à temperatura ambiente.

Como anteriormente referido, a maior precaução a tomar durante os processos de manipulação (electroforese e transferência para a membrana de PVDF) será impedir o bloqueio do N-terminal da cadeia polipeptídica. Para tal, foram efectuadas algumas alterações na preparação das soluções "stock" de electroforese (Tabela A.6). O gel é preparado usando os volumes das soluções "stock" indicadas na Tabela A.6a. Após a polimerização, deve-se deixar o gel à temperatura ambiente, pelo menos duas horas, para garantir uma polimerização total e homogénea. Depois, faz-se uma pré-electroforese sem aplicar as amostras, adicionando 150 µl de glutatona (Solução VIII) a 150 ml de tampão de electroforese ao reservatório superior (cátodo). A pré-electroforese é efectuada por aplicação de uma corrente constante de 3 mA, durante 2 horas.

A pré-electroforese tem como objectivo: 1) a remoção de quaisquer impurezas com carga; 2) a redução dos radicais peróxido e radicais residuais formados durante a polimerização e 3) a eliminação de espécies reactivas não carregadas, tais como monómeros de acrilamida, acroleína ou outros compostos carbonilo, que poderão bloquear o N-terminal, impedindo a degradação de Edman.

Às amostras (~20 µg em 10 µl por "poço") adicionam-se 10 µl de tampão para amostras (solução VII) e levam-se a 60 °C, durante 10 a 15 minutos. Deixam-se arrefecer e aplicam-se no gel. No reservatório superior da tina, junta-se 150 µl de tioglicolato de sódio (solução IX) a 150 ml de tampão de electroforese, para impedir a degradação dos resíduos de triptofano e metionina. Corre-se o gel a 7 mA, durante cerca de 2 horas e 30 minutos.

Tabela A.6

Soluções "Stock" para electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS para posterior transferência electroforética para membrana PVDF

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão do gel de resolução (I)	Tris Base, 1.5 M HCl H ₂ O	36.34 g até pH 8.8 até 200 ml	pH=8.8-9.0
Tampão do gel concentrador (II)	Tris Base, 0.5 M HCl H ₂ O	12.11 g até pH 6.8 até 200 ml	pH=6.6-6.8
Acrilamida (30%) /bisacrilamida (0.8%) (III)	Acrilamida Bisacrilamida H ₂ O	30 g 0.8 g 100 ml	—
SDS★ a 0.4% (IV)	SDS★ H ₂ O	40 mg 10 ml	Preparar antes de usar
Persulfato de amónia a 10% (V)	Persulfato de amónia H ₂ O	0.1 g 1 ml	Preparar antes de usar
Tampão de electroforese Tris-Glicina (VI)	Tris Base, 0.25 M Glicina, 1.92 M H ₂ O	3.03 g 14.41 g até 1000 ml	pH=8.3 Adicionar 1g de SDS antes de usar
Tampão para as amostras (VII)	Glicerol β-mercaptoetanol SDS★ Solução II Azul de bromofenol H ₂ O	1 ml 0.5 ml 0.3 g 1.25 ml 2 mg até 10 ml	—
Glutationa (VIII)	Glutationa, 50 mM H ₂ O	0.154 g 10 ml	Preparar antes de usar
Tioglicolato de sódio (IX)	Tioglicolato, 100 mM H ₂ O	22.82 mg 2 ml	Preparar antes de usar

★ O SDS usado foi previamente recristalizado em etanol/H₂O, segundo o método descrito no texto.

As soluções I a VII deverão ser filtradas com papel de filtro *Millipore* (0.2 µm) e guardadas em frascos de vidro escuro. As soluções I a III e VI deverão ser mantidas a 4 °C; as soluções VIII e IX deverão ser preparadas antes de usar ou mantidas a -20 °C.

Tabela A.6a

Volumes necessários para a preparação de um gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS para posterior transferência electroforética para membrana PVDF.

Solução "Stock"	Gel concentrador (2 ml)	Concentração final de acrilamida no gel de resolução			
		(volumes para 5 ml)			
		5%	10%	12.5%	15%
III	0.33	1.33	1.67	2.0	
II	0.5	—	—		
I	—	1.0	1.0	1.0	
IV	0.5	1.0	1.0	1.0	
H ₂ O	0.67	0.67	0.41	—	
Desarejar as soluções durante 5 minutos					
V	15	15	15	15	
TEMED (μl)	2	2	2	2	

A transferência electroforética dos componentes separados por electroforese para a membrana de PVDF é efectuada numa tina da *Bio-Rad* (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*). As soluções usadas vêm descritas na Tabela A.7. Para aumentar a eficiência de transferência, usa-se tampão 10 mM CAPS a pH 11.0.

Tabela A.7

Soluções "Stock" para a transferência electroforética para membrana de PVDF

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão de transferência	CAPS, 100 mM	22.13 g	pH = 11.0
	NaOH	até pH 11	Diluir 1:10 com metanol a 10% Guardar a 4 °C
	H ₂ O	até 1000 ml	
Metanol	Metanol, 100 %	—	—
Solução corante	Ponceau S	0.4 mg	—
	Ácido acético	2 ml	
	H ₂ O	198 ml	

As etapas envolvidas na transferência electroforética para membrana PVDF são descritas seguidamente:

1. Remover o gel das placas de electroforese e transferi-lo para 100 ml de tampão de transferência, mantendo-o 5 minutos nesta solução;
2. Entretanto, "embebe-se" a membrana de PVDF com 100% de metanol. Após alguns segundos (~ 20 segundos), transfere-se para um recipiente que contém tampão de transferência;

Nota: É importante que a membrana esteja bem impregnada em metanol, antes de transferi-la para o tampão. Se ainda estiver seca, deve-se repetir a operação.

3. Recortar 2 folhas de papel filtro (*Whatman* 3MM) com o mesmo tamanho da membrana PVDF (~ 7 x 8 cm). Impregnar as folhas de papel de filtro e as esponjas da "cassete" da tina de transferência em tampão de transferência, usando um segundo recipiente, antes de montar a "sanduíche";
4. Prepara-se a "sanduíche", de acordo com a Figura A.3;

5. Introduz-se a "sanduíche" na tina de transferência e enche-se com tampão (~ 1 litro);
6. Faz-se a transferência a uma voltagem constante de 50 V, à temperatura ambiente, durante 30 minutos;
7. Remove-se a membrana de PVDF da "sanduíche" de transferência e lava-se com água destilada antes de se proceder à detecção das bandas de proteína que, agora, se encontram imobilizadas na membrana;
8. A detecção das proteínas (ou subunidades) é efectuada por coloração com Ponceau S, mantendo-se uma agitação suave. As bandas são visíveis após alguns minutos;
9. Extrai-se o excesso de corante com água destilada e cortam-se as bandas a analisar. Deixam-se secar ao ar. Se a determinação da sequência não for efectuada logo após a transferência, deve-se saturar o micro-tubo que contém as proteínas imobilizadas na membrana com uma atmosfera inerte e guardá-las a -20 °C.

As amostras assim imobilizadas são sujeitas à degradação de Edman, *in situ*, num sequenciador automático, sendo possível determinar a sequência de ácidos aminados de uma proteína.

A.6. Hidrólise ácida e oxidação perfórmica

A composição em ácidos aminados foi determinada por hidrólise ácida de acordo com o método de Moore e Stein.¹⁰ A amostra a analisar (~10 nmol, amostras em triplicado) é seca sob uma corrente de argon e depois ressuspensa em 200 µl de uma solução 6 N de HCl (contendo 1 mg/ml de fenol). Retira-se todo o ar das amostras com ciclos de argon e vácuo, selam-se os tubos de hidrólise e incubam-se a 110 °C. As amostras são retiradas após 22, 44 e 72 horas, respectivamente, pois existem alguns ácidos aminados que são mais susceptíveis de degradação ao longo do tempo.

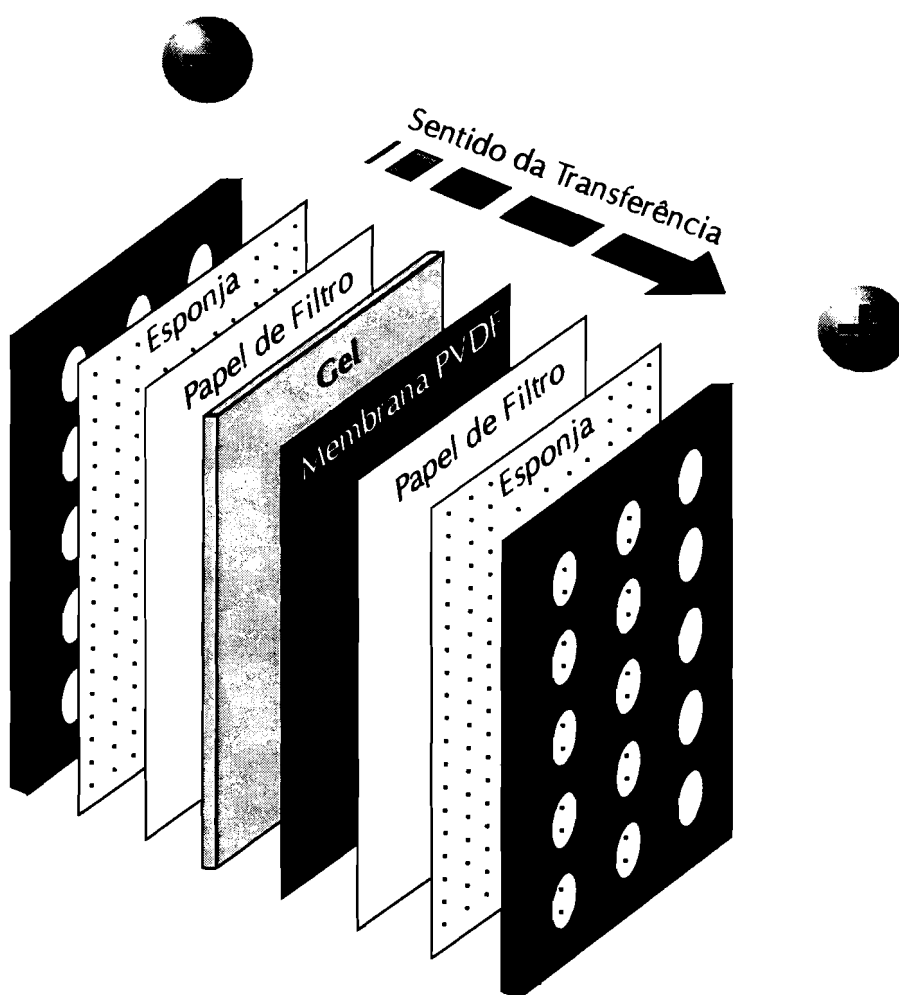


Figura A.3. Esquema para a preparação da "sanduíche" para a transferência electroforética para membrana de PVDF.

As amostras são, depois, liofilizadas e ressuspensas em tampão Na-S (*Beckman*). Após filtração podem ser injectadas num analisador.

A análise de ácidos aminados foi efectuada num analisador automático (*Beckman High Performance Analyzer System 6300 E*). Os valores referentes à treonina, serina e tirosina foram corrigidos após extrapolação ao tempo zero, por serem os ácidos aminados mais susceptíveis de degradação. Os resíduos de cisteína e metionina foram analisados como as suas formas oxidadas, ácido cisteico e metionina sulfona, respectivamente, após oxidação perfórmica.

Na oxidação perfórmica usa-se um reagente que contém ácido fórmico (10 ml), peróxido de hidrogénio (1 ml) e fenol (0.1 ml). Após 1 hora de incubação do reagente perfórmico, ao abrigo da luz, adicionam-se 30 µl deste a cada amostra de proteína a analisar (previamente seca sob uma corrente de azoto). Incuba-se, 1 hora, em gelo e na ausência de luz. De seguida, adicionam-se 6 ml de éter para eliminar o excesso de reagente perfórmico, e deixa-se incubar durante 30 minutos, a -20 °C. A amostra é centrifugada a 6000 x g, durante 5 minutos. No tubo de centrifugação podem observar-se duas fases. Retira-se a fase superior (éter) e adicionam-se mais 6 ml de éter à restante mistura. Centrifuga-se uma segunda vez, repetindo-se a operação anterior. À amostra, seca sob azoto, adicionam-se 200 µl de HCl 6 N (com 1mg/ml de fenol) e transfere-se a amostra para um tubo de hidrólise, que será tratada do modo descrito anteriormente e incubada a 110 °C.

A.7. Ensaios de actividade da redutase do APS

A.7.1. Ferricianeto como aceitador de electrões

A actividade da redutase do APS é determinada seguindo a metodologia descrita por Bramlett e Peck, e mais tarde modificada por Lampreia e colaboradores.^{11,12} As soluções necessárias são apresentadas na Tabela A.8.

Em qualquer dos ensaios, junta-se 300 µl de cada solução, e perfaz-se a 3 ml com água. A medida da velocidade de redução do ferricianeto será seguida por leitura da absorvância a 420 nm, num espectrofotómetro de duplo feixe. Em cada célula de UV/visível coloca-se 1 ml da mistura reaccional. A reacção é iniciada pela adição da enzima à célula de medida.

Assumindo que são reduzidas duas moles de ferricianeto por cada mole de sulfito que é oxidada (e portanto 1 mole de APS produzida), as actividades são calculadas, com base no coeficiente de extinção molar para o ferricianeto, medido a 420 nm, igual a 1050 M⁻¹cm⁻¹.

A.7.2. Citocromo *c* de cavalo como aceitador de electrões

Neste ensaio, a reacção de oxidação da molécula de sulfito é geralmente efectuada em tampão glicina-NaOH a pH 9.5.¹¹ Segue-se, espectrofotometricamente, o aumento da absorvância a 550 nm ao longo do tempo de reacção, que corresponderá à velocidade de redução do citocromo *c*. Usou-se um coeficiente de extinção molar para o citocromo *c*, medido a 550 nm, igual a 29000 M⁻¹cm⁻¹.

As soluções necessárias para a execução deste ensaio são apresentadas na Tabela A.8.

Em ambos os ensaios, as actividades foram calculadas em unidades de µmoles APS/min. As actividades específicas da redutase do APS foram determinadas, dividindo o valor da actividade pela proteína adicionada ao ensaio (em mg).

Tabela A.8

Soluções "Stock" usadas na determinação da actividade da redutase do APS

Soluções	Preparação	Observações
<i>Ferricianeto como aceitador de electrões</i>		
Ferricianeto de potássio, 1.3×10^{-2} M	0.107 g de ferricianeto em 25 ml de H ₂ O	Preparar antes de usar
Sulfito de sódio, 3×10^{-2} M (com 5×10^{-2} M de EDTA)	94.5 g de Na ₂ SO ₃ + 0.453 g de EDTA em 25 ml de H ₂ O	Preparar antes de usar
AMP, 3×10^{-2} M	0.122 g de AMP em 10 ml de H ₂ O	—
β-Mercaptoetanol, 5×10^{-3} M	8.75 µl em 25 ml de H ₂ O	Preparar antes de usar
Tampão Tris-HCl, 1 M (pH 7.6)	—	—
<i>Citocromo c como aceitador de electrões</i>		
Citocromo c★, 3.3×10^{-4} M	10.2 mg de citocromo c em 25 ml de H ₂ O	—
Sulfito de sódio, 3×10^{-3} M (com 5 mM de EDTA)	9.45 g de Na ₂ SO ₃ + 45.3 mg de EDTA em 25 ml de H ₂ O	Preparar antes de usar
AMP, 3×10^{-2} M	0.122 g de AMP em 10 ml de H ₂ O	—
β-Mercaptoetanol, 5×10^{-3} M	8.75 µl em 25 ml de H ₂ O	Preparar antes de usar
Tampão Glicina-NaOH, 1 M (pH 9.5)	—	—

★ Usou-se citocromo c de coração de cavalo da SIGMA

A.8. Titulações potenciométricas

As titulações potenciométricas foram realizadas em células anaeróbicas, semelhantes às descritas por Dutton.^{13,14} O potencial de oxidação-redução das amostras foi medido através de um eléctrodo de platina (*Radiometer*), usando um eléctrodo saturado de calomelanos (*Radiometer*) como referência. Os eléctrodos foram calibrados com uma solução saturada de quinidrona a pH 7.0, sabendo que o potencial medido, em relação ao eléctrodo de hidrogénio, é dado pela seguinte equação:

$$E_Q \text{ (Volts)} = 0.6998 - 0.059 \times \text{pH}$$

O factor de correcção dos potenciais de oxidação-redução lidos durante a titulação é calculado, subtraindo o valor calculado pela equação anterior, ao valor de potencial medido na calibração (a pH 7.0, $E_Q \sim 0.287$ V). A correcção faz-se, então, por adição do factor de correcção aos valores de potencial obtidos ao longo da titulação.

A.8.1. Titulações acopladas à espectroscopia de UV/visível

À solução de redutase do APS a titular, com uma concentração aproximada de 10 mM (~3 ml) em tampão 0.1 M Tris-HCl pH 7.6, adiciona-se uma mistura de mediadores electrónicos (Tabela A.9), cuja gama de potenciais compreende os valores a determinar. A concentração de mediadores deve ser tal que a razão mediadores:proteína não deverá ser superior a 1:100.

Os redutores químicos usados encontravam-se nas seguintes concentrações: ditionito de sódio, 0.2 M em tampão 0.2 M Tris-HCl pH ~8.0 e sulfito de sódio, 3 mM (com 5 mM EDTA).

A titulação é efectuada pela adição de alíquotas de titulante, mantendo a célula em condições anaeróbicas.

A.8.2. *Titulações acopladas à espectroscopia de RPE*

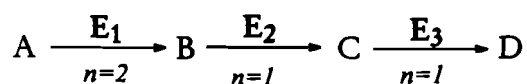
O procedimento seguido é semelhante ao descrito anteriormente. Neste caso, no entanto, a concentração da proteína tem que ser bastante superior (120 a 150 μM) à usada nas titulações seguidas espectrofotometricamente.

A titulação da amostra (3ml), preparada do modo atrás descrito, é feita por adição de alíquotas de metilo de viologénio reduzido com zinco (0.2 M de metilo de viologénio em 0.2 M Tris-HCl, pH \sim 8.0) ou de ditionito de sódio (0.2 M em 0.2 M Tris-HCl, pH \sim 9.0). Após estabilização do potencial, retira-se uma amostra para um tubo de RPE, que é imediatamente congelado em azoto líquido, sob uma atmosfera de argon.

A.8.3. *Análise das curvas de titulação*

Os valores de potencial de oxidação-redução obtidos durante a titulação são corrigidos segundo o descrito anteriormente e posteriormente ajustados a uma curva de Nernst terórica, para se poder estimar o potencial a meia altura da cada transição.

As curvas determinadas por titulação seguida por UV/visível, foram ajustadas assumindo a seguinte sequência de transições de oxidação-redução:



Assumindo que p_A , p_B , p_C e p_D são as fracções das espécies A, B, C e D, respectivamente, presentes em solução, tem-se:

$$p_A + p_B + p_C + p_D = 1 \quad [1]$$

As equações de Nernst para cada transição, a 25 °C, poderão ser escritas do seguinte modo:

$$E = E_1 + \frac{0.059}{2} \log \frac{P_A}{P_B}$$

$$E = E_2 + 0.059 \log \frac{P_B}{P_C}$$

$$E = E_3 + 0.059 \log \frac{P_C}{P_D}$$

Para cada ponto de equilíbrio ter-se-á:

$$P_A = P_B \times 10^{\left(\frac{E-E_1}{0.059} \times 2\right)}$$

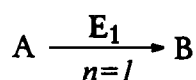
$$P_C = P_B \times 10^{\left(\frac{E_2-E}{0.059}\right)}$$

$$P_D = P_B \times 10^{\left(\frac{E_2+E_3-2E}{0.059}\right)}$$

Substituindo na equação [1], a expressão obtida para cada espécie e escrevendo em função de P_B , obtém-se:

$$P_B = \frac{1}{\left[1 + 10^{\left(\frac{E-E_1}{0.059} \times 2\right)} + 10^{\left(\frac{E_2-E}{0.059}\right)} + 10^{\left(\frac{E_2+E_3-2E}{0.059}\right)} \right]}$$

No caso das titulações por RPE, considerou-se apenas a redução mono-electrónica de uma única espécie (centro I) da redutase do APS, de acordo com o esquema reaccional:



A partir daqui, os cálculos seguintes são semelhantes aos descritos anteriormente.

Tabela A.9

Potenciais de oxidação-redução, a pH 7.0, dos mediadores usados nas titulações potenciométricas

Mediador	Potencial (mV)
2,6-diclorofenol indofenol	+ 217
2,5-dimetilbenzoquinona	+ 180
Fenazina meta-sulfato	+ 80
5-hidroxi-1,4-naftoquinona	+ 30
Azul de metileno	+ 11
Piocianina	-34
Indigo tetra-sulfonato	-46
Resorufina	-51
Fenazina	-125
2-hidroxi-1,4-antraquinona	-152
Fenosafrafrina	-252
Safranina	-289
Diquat	-361
Vilogenio de metilo	-440
Triquat	-550

A.9. Espectrofotómetro de UV/visível

Os espectros de UV/visível foram adquiridos num espectrofotómetro Shimadzu UV-265FS. A digitalização dos respectivos espectros foi efectuada usando o programa PC-265 (versão 3.1) e um computador IBM PC-XT.

A.10. Espectrómetro de RPE

Os espectros de RPE, à temperatura do hélio líquido, foram adquiridos num espectrómetro Bruker ESP 300 equipado com uma cavidade modelo 4102M (modo perpendicular) e um criostato de fluxo contínuo ESR 900 (*Oxford Instruments*).

A concentração das amostras de redutase do APS analisadas variou entre 170 e 185 μM . As quantificações de spins foi efectuada em relação a uma amostra de CuEDTA (2 mM) nas mesmas condições das amostras.

A simulação dos espectros de RPE foi realizada utilizando um programa de simulação para espectros de amostras em pó (EPRBOX).

A.11. Espectrómetro de Mössbauer

Os espectros de Mössbauer foram adquiridos num espectrómetro equipado com um magneto de 0.5 kG (orientação variável), com modo de aceleração constante, numa geometria de transmissão.

O zero da velocidade do espectro de Mössbauer foi calculado para o centro de gravidade do espectro do ferro metálico à temperatura ambiente. A conversão das abcissas de canais para velocidade (mm/s) é efectuada por ajuste do espectro obtido com seis gaussianas e sabendo que as posições teóricas dos seis picos são -5.3123, -3.0760, 0.8397, 3.0760 e 5.3123 mm/s, respectivamente.

A.12. Bibliografia

1. Liu, M.-C., e Peck, H.D., Jr. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**, 13159-13164.
2. Huynh, B.H., Liu, M.C., Moura, J.J.G., Moura, I., Ljungdahl, P.O., Münk, E., Payne, W.J., Peck, H.D., Jr., DerVartanian, D.V., e LeGall, J. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**, 9576-9581.
3. LeGall, J., Mazza, G., e Dragoni, N. 1965. *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 385-387.
4. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., e Randall, R.J. 1951. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
5. Fischer, D.S., e Price, D.C. 1964. *Clin. Chem.* **10**, 21-31.
6. Laemmli, U.K. 1970. *Nature* **227**, 680-685.
7. Yuen, S., Hunkapiller, M.W., Wilson, K.J., e Yuan, P.M. 1986. *User Bolletín Appl. Biosystem* n° 25.
8. Choli, T., e Wittmann-Liebold, B. 1990. *Electrophoresis* **11**, 562-568.
9. Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F., e Hood, L.E. 1983. *Methods in Enzymology* **91**, 227-237.
10. Moore, S., e Stein, W.H. 1963. *Methods in Enzymology* **46**, 41-45.
11. Bramlett, R.N., e Peck, H.D., Jr. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**, 2979-2986.
12. Lampreia, J. 1989. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Univ. Nova de Lisboa.
13. Dutton, P.I. 1978. *Methods in Enzymology* **54**, 411-434.
14. Tavares, P.A.B. 1994. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

